

Clermont Ferrand

ANNALES
DES
SCIENCES NATURELLES

BOTANIQUE
ET BIOLOGIE VÉGÉTALE

EXTRAIT

DÉTERMINISME DE LA RAMIFICATION
ET DU BOURGEONNEMENT
CHEZ LE PROTONÉMA DE BRYALES

Par M^{me} LARPENT-GOURGAUD

12^e Série — Tome X — Fascicule 1 — 1969

MASSON & C^{ie}, ÉDITEURS
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS (VI^e)

DÉTERMINISME DE LA RAMIFICATION ET DU BOURGEONNEMENT CHEZ LE PROTONÉMA DE BRYALES

Par M^{me} LARPENT-GOURGAUD

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
MATÉRIEL ET TECHNIQUES	7
I. — Espèces utilisées	7
II. — Entretien des cultures	8
III. — Obtention des protonémas	8
IV. — Conditions de culture	8
V. — Milieux de culture expérimentaux	9
VI. — Etablissement des courbes de croissance	11
VII. — Techniques de micromanipulation	11
CHAPITRE PREMIER. — <i>Quelques généralités sur la croissance et la différen- ciation du protonéma.</i>	12
I. — Morphogenèse des jeunes germinations de spores	13
A. — Recherches des corrélations susceptibles d'exister entre les axes	13
B. — Influence de la spore sur le pouvoir de ramification des axes ..	15
C. — Influence de l'inoculum (nombre de spores) sur la croissance du protonéma	20
II. — Etude des caractères originaux des boutures de filaments proto- nématiques	22
A. — Etude de la régénération	22
B. — Etude de la morphologie comparée des protonémas issus de spores ou de boutures	24
CHAPITRE II. — <i>Mise en évidence de corrélations d'inhibition dans le pro- tonéma des Bryales</i>	25
I. — Absence de corrélations de croissance entre les axes du protonéma de quelques Bryales cultivées à la lumière (1 200 lux)	25
A. — Analyse de la croissance du protonéma de <i>Funaria hygrometrica</i> (Hedw.)	25
B. — Comportement d'autres espèces de Bryales	27

II. — <i>Mise en évidence de corrélations d'inhibition dans le protonéma des Bryales cultivé à l'obscurité</i>	29
A. — Analyse de la croissance du protonéma de <i>Ceratodon purpureus</i> (Brid.)	29
B. — Analyse de la croissance du protonéma de <i>Funaria hygrometrica</i> (Hedw.)	31
C. — Nature corrélatrice de la dominance apicale	32
CHAPITRE III. — <i>Définition et évolution des paramètres de la croissance</i> ..	37
I. — <i>Définition des divers paramètres de la croissance et de la ramification</i>	37
A. — La croissance en longueur	37
B. — La ramification	38
II. — <i>Variations des divers paramètres en fonction du temps</i>	39
A. — Cultures à la lumière	39
B. — Cultures à l'obscurité	43
C. — Comparaison de l'évolution des paramètres à la lumière et à l'obscurité	44
CHAPITRE IV. — <i>Action de la lumière sur la croissance et la ramification du protonéma</i>	45
I. — <i>Variations de la croissance et de la ramification en fonction de l'éclairement</i>	45
II. — <i>Croissance et ramification du protonéma cultivé en lumières monochromatiques</i>	48
A. — Spectre d'action de la croissance du protonéma	49
B. — Spectre d'action de la ramification du protonéma	50
C. — Discussion	52
III. — <i>Action comparée du sucre et de la lumière sur la croissance et la ramification du protonéma de Ceratodon purpureus (Brid.)</i>	53
CHAPITRE V. — <i>Mécanismes responsables des corrélations d'inhibition dans le protonéma des Bryales</i>	57
I. — <i>Etude d'un facteur de ramification : l'acide traumatique</i>	57
A. — Essais relatifs à des substances stimulatrices de la croissance ..	57
B. — Action de l'acide traumatique	58
II. — <i>Inhibition spécifique de la ramification : mise en évidence du rôle des ARN</i>	60
A. — Action de la 8-azaguanine	60
B. — Action de la D-actinomycine sur la morphogenèse du protonéma de <i>Ceratodon purpureus</i> (Brid.) cultivé à l'obscurité	62
C. — Action de la ribonucléase sur la morphogenèse du protonéma de <i>Ceratodon purpureus</i> (Brid.)	62
CHAPITRE VI. — <i>Ramification et bourgeonnement à l'obscurité du protonéma des Bryales</i>	65
I. — <i>Démonstration du rôle indispensable de la ramification dans la caulogenèse</i>	65
A. — Conditions nécessaires au bourgeonnement du protonéma de <i>Funaria hygrometrica</i> (Hedw.)	65
B. — Conditions nécessaires au bourgeonnement du protonéma de <i>Ceratodon purpureus</i> (Brid.)	69



II. — <i>Etude de la différenciation des bourgeons</i>	69
A. — Différentes étapes de la différenciation des bourgeons	70
B. — L'aptitude au bourgeonnement est fonction de l'âge du protonéma	72
III. — <i>Action de la D-actinomycine sur le bourgeonnement</i>	74
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES	77
RÉSUMÉ	91
BIBLIOGRAPHIE	93

Introduction.

Le protonéma des Bryales, comme le thalle des champignons, est un ensemble de filaments ramifiés, à croissance strictement apicale (CAMPBELL, 1928; KOFLER, 1959). Les relations physiologiques existant entre un filament principal et les ramifications qu'il porte ont été peu étudiées.

PRINGSHEIM et PRINGSHEIM (1935) signalent que, chez *Ceratodon purpureus*, la culture à l'obscurité fait apparaître des axes principaux en croissance rapide et des ramifications latérales qui restent inhibées. Soumis aux mêmes conditions de culture, le protonéma de *Funaria* ne porte plus de rameaux latéraux. ALLSOPP et MITRA (1956), sur une douzaine d'espèces de Bryales, distinguent un système prostré d'axes et un système dressé de ramifications. Cette morphologie correspondrait au « stade hétéotriche », pour reprendre la terminologie employée par FRITSCH (1935) chez les algues. Alors que chez les espèces comme la *Funaria*, le *Ceratodon*, le *Pohlia nutans*, le *Leptobryum pyriforme*, le *Bryum capillare* et l'*Eurynchium riparioides*, axes et ramifications se développent de manière tout à fait comparable, chez le *Pleuroidium acuminatum*, le système dressé a un développement plus important que le système prostré.

Cependant, des expériences précises, cherchant à mettre en évidence des phénomènes de corrélations de croissance entre axes et ramifications, analogues à ceux décrits par LARPENT (1966) chez les champignons, n'ont jamais été réalisées. Un système ramifié comme celui du protonéma présente-t-il des corrélations d'inhibition comparables à une dominance apicale dont les critères ont été définis par GOEBEL (1908), WENT et THIMANN (1937), CHAMPAGNAT (1965), chez les végétaux supérieurs, par WARDLAW (1961) chez les cryptogames vasculaires, par BERTHIER (1961, 1965) chez les pousses feuillées des Bryophytes, et par LARPENT (1966) chez les champignons.

Rappelons ces critères :

a) Une vitesse de croissance différente de l'organe dominant et des organes dominés. Une dominance totale se manifeste par la disparition de ces derniers. La croissance continue de l'axe principal est opposée à l'arrêt précoce ou à l'avortement des ramifications qu'il porte.

b) Une reprise ou une accélération de la croissance des organes dominés après ablation de l'organe dominant.

c) Un pourcentage de rameaux inhibés (critère défini chez les champignons) permettant de mesurer les relations existant entre l'axe et ses rameaux : 100 % d'ébauches inhibées correspondent à une dominance parfaite; 100 % d'ébauches développées indiquent une dominance apicale nulle.

Malgré les faits signalés ci-dessus, rien de tel n'a encore été mis

en évidence chez les Bryales au stade protonématique. C'est pour combler cette lacune que nous avons entrepris ces recherches. D'autre part, il nous a semblé très intéressant de mener cette étude en comparaison avec celle faite sur les champignons, puisque si les mêmes procédés techniques sont applicables dans les deux cas, on peut opposer l'autotrophie des unes à l'hétérotrophie des autres.

Comme ce fut le cas pour les champignons, l'application, au développement du protonéma, des critères définis chez les végétaux supérieurs soulève de nombreux problèmes que nous rappellerons brièvement.

Un axe principal, né d'une spore en germination ou régénéré par une bouture, pourrait être comparé à une tige de plante supérieure. L'apex de ce filament, comme l'apex épicotylaire, est le siège de synthèses nucléaires et cytoplasmiques intenses. Mais les ramifications engendrées près du sommet d'un filament sont-elles physiologiquement comparables aux méristèmes axillaires des végétaux supérieurs ?

Si une hiérarchie des rameaux existe, peut-elle s'expliquer par une dominance exercée par un apex sur les autres ? Une comparaison entre la vitesse de croissance des axes principaux et celle des rameaux qu'ils portent est également importante. C'est ce que nous avons essayé de rechercher en étudiant diverses espèces de Bryales.

Si des corrélations existent, la suppression des organes dominants doit provoquer la reprise de croissance des organes dominés. De telles ablations, efficaces sur une plantule de pois, le sont-elles également sur un protonéma ?

La préséance exercée par un axe principal est-elle explicable par sa meilleure nutrition, comme cela a été prouvé chez certaines plantes supérieures (GREGORY et VEALE, 1957; HUGON, 1967), et chez les champignons (LARPENT, 1966).

Toutefois, le protonéma de Bryales offre un plus grand nombre de possibilités originales pour des études de morphogenèse.

1° Les observations peuvent être faites à l'échelle cellulaire.

— Nous pouvons comparer le protonéma né d'une spore à celui obtenu à partir d'une bouture unicellulaire.

— Il devient possible de scinder, dans l'étude de la croissance d'un filament, la part prise par l'élongation cellulaire de celle liée à une augmentation du nombre de cellules.

— On est en mesure de compter séparément les mitoses à l'origine des ébauches latérales, de celles responsables de la croissance en longueur. Comme nous le verrons, cette distinction s'est révélée fondamentale pour le matériel étudié. Ceci s'avérerait impossible chez les champignons où, dans la plupart des cas, la cellule est mal définie.

2° En réalisant des cultures à l'obscurité, il est possible de comparer le même organisme dans des conditions hétérotrophes, puis autotrophes. Les réserves de la spore sont en effet insuffisantes pour assurer, à l'obscurité, une croissance des filaments comparable à celle observée à la lumière.

3° Les spores des Bryales et des Ptéridophytes ont une constitution voisine. Le mode de croissance ainsi que la morphologie d'ensemble du protonéma rappellent beaucoup celle d'un jeune prothalle de Ptéridophytes. N'est-il pas possible de rapprocher la ramification du protonéma de Bryales de la croissance bidimensionnelle du prothalle de fougères ? L'allongement des axes principaux chez les Bryales correspondrait à la croissance unidimensionnelle des germinations de Ptéridophytes, la formation des ébauches latérales à la constitution de la lame prothallienne.

Cela revient encore à séparer deux types de mitoses : celles perpendiculaires à l'axe du filament qui assurent son allongement, et celles obliques qui engendrent les ramifications. Elles n'ont jamais lieu en même temps dans une même cellule, la mitose perpendiculaire précédant toujours la mitose oblique. Cette dernière est préparée, semble-t-il, par des phénomènes membranaires et cytoplasmiques puisque, lors de la mise en place d'une ébauche, c'est d'abord la membrane qui se modifie à la partie supérieure d'une cellule, pour engendrer un diverticule. Quand celui-ci est bien distinct, le noyau arrive à son niveau, et se divise sans y pénétrer, seul le noyau fils passe dans l'ébauche, et le phragmoplaste apparaît, séparant alors la jeune ramification de la cellule mère (M. BOPP, film 1966).

De tels phénomènes semblent s'opposer, à première vue, à tout aspect corrélatif du développement.

4° Après une période de croissance indifférenciée, des phénomènes d'organogenèse et d'histogenèse assurent les étapes ultérieures de la morphogenèse du protonéma. Au quatorzième jour de culture, le chloronéma engendre progressivement du caulonéma, sur lequel se mettent en place les ébauches caulinaires qui se développent à partir de ramifications latérales. Si les étapes de cette organogenèse sont bien connues, à la lumière (GORTON et EAKIN, 1957; BOPP et BRANDES, 1964; BOPP, 1965), il était jusqu'alors impossible d'obtenir des résultats positifs à l'obscurité. Les rares cas étudiés (PRINGSHEIM et PRINGSHEIM, 1935; FRIES, 1945; KEIL, 1949) faisaient l'objet de nombreuses contestations (MITRA et ALLSOPP, 1959). Une partie de notre recherche a eu pour but de combler cette lacune.

Notre étude a donc porté à la fois sur le système ramifié simple, représenté par le chloronéma réduit à des centres de synthèses susceptibles d'entrer en compétition, et sur les différentes étapes de la caulogenèse à l'obscurité.

Le premier chapitre de ce mémoire sera consacré aux principaux problèmes méthodologiques posés par le matériel expérimental. Nous étudierons la morphologie des germinations issues de spores. Nous comparerons le protonéma avec celui provenant de la régénération de boutures uni ou pluricellulaires. Enfin, nous préciserons les rapports complexes existant entre les spores au cours des phénomènes de germination et au début de la croissance.

L'étude comparée de deux espèces, *Funaria hygrometrica* et *Cera-*

todon purpureus cultivés à la lumière ou à l'obscurité (chap. II), permettra de mettre en évidence un cas de dominance apicale typique dans le protonéma de Bryales. Nous montrerons que les principaux critères définis chez les végétaux supérieurs et chez les champignons peuvent être retrouvés chez ces organismes.

Nous serons alors amenés dans le troisième chapitre à définir, avec précision, les paramètres permettant une étude quantitative de ces phénomènes de corrélation : longueur moyenne des cellules, nombre de cellules formées par unité de temps ou rythme des mitoses, vitesse de croissance résultant des deux facteurs précédents, rapport R/N (entre le nombre total R de rameaux latéraux observés et le nombre total N de cellules dénombrées sur un filament d'âge connu) et le pourcentage de rameaux inhibés.

Dans le chapitre IV, les variations de cette dominance apicale seront étudiées en fonction de l'éclairement.

Dans le chapitre V, nous tenterons de dégager les mécanismes responsables des corrélations à l'intérieur du protonéma, en utilisant un certain nombre d'inhibiteurs spécifiques du métabolisme. Nous envisagerons plus spécialement des inhibiteurs des acides nucléiques, la ramification apparaissant comme une différenciation cellulaire particulière, sous la dépendance du noyau.

Enfin, dans le chapitre VI, seront mises en évidence les relations existant entre la ramification et la caulogenèse dans les cultures à l'obscurité.

Dans la discussion, nous comparerons nos résultats avec ceux obtenus chez les champignons, voire même chez les végétaux supérieurs. Nous soulignerons tout particulièrement les analogies constatées entre la morphogenèse du protonéma des Bryophytes et celle du prothalle des Ptéridophytes.

MATÉRIEL ET TECHNIQUES

I. — *Espèces utilisées.*

Les diverses espèces utilisées dans nos expériences sont :

- *Funaria hygrometrica* Hedw.
- *Ceratodon purpureus* Brid.
- *Leptobryum pyriforme* Hedw.
- *Bryum argenteum* Hedw.
- *Tortula muralis* Hedw.
- *Dicranum scoparium* Hedw.
- *Atrichum undulatum* P. Beauv.

II. — *Entretien des cultures.*

Le milieu d'entretien pour les diverses souches est le milieu A de Kofler (1959).

Les cultures sont mises dans une étuve éclairée à $23^{\circ} \pm 1$. L'éclairement est donné 24 heures sur 24, et s'élève en moyenne à 1 400 lux. Les souches ainsi obtenues sont régulièrement repiquées tous les mois.

III. — *Obtention des protonémas.*

Les jeunes protonémas sont obtenus :

a) soit à partir de germination de spores : après stérilisation d'une capsule à l'alcool à 95° pendant 2 minutes, des cultures monospores sont réalisées en chambre de Van Tieghem à l'aide d'une aiguille de verre étirée à la microforge de Fontbrune.

b) soit à partir de jeunes cultures en boîtes de Pétri de 10 cm sur milieu A de Kofler (1959), mises à l'étuve éclairée à 23° C pendant 10 jours.

La réalisation des boutures à partir de filaments protonématiques nécessite la présence d'un support plus résistant que la gélose. A cet effet, les spores sont semées sur une feuille de cellophane appliquée sur le milieu gélosé selon la technique de BOPP, JAHN et KLEIN (1964).

Quelques jours avant leur utilisation, les colonies ainsi développées sont éloignées de la lumière pour obtenir des filaments protonématiques plus distants et moins touffus.

A l'aide d'un microscalpel, des fragments de filament sont prélevés au voisinage de la frange de la colonie. Pour cela, on découpe un morceau de cellophane d'une surface minimale de 15 mm^2 autour de la bouture, qui est ensuite prélevé stérilement et appliqué directement sur le milieu gélosé.

Les expériences de microchirurgie sont réalisées à l'aide d'un laser à rubis.

IV. — *Conditions de culture.*

a) **Degré hygrométrique.** — L'atmosphère des chambres de Van Tieghem est saturée grâce à l'eau distillée placée au fond de l'anneau. Une mince pellicule d'eau entoure constamment les filaments protonématiques.

b) **Température.** — Toutes les cultures sont mises dans des étuves thermorégulées à $23^{\circ} \pm 1^{\circ}$ C.

c) **Eclairement.** — 1° *Les cultures ont été faites à l'obscurité et sous divers éclairagements.*

Les éclairagements mesurés perpendiculairement aux sources lumineuses et au niveau des chambres de culture sont respectivement :

101 $\pm$ 25	826 $\pm$ 68
300 $\pm$ 50	966 $\pm$ 51
426 $\pm$ 51	1 190 $\pm$ 40

Nous les désignerons par la suite : 100, 300, 400, 800, 1 000 et 1 200 lux.

2° *L'éclairage en lumière monochromatique* a été réalisé grâce à l'illuminateur spectral à réseaux du plytotron de Gif/Yvette mis au point par JACQUES, CHABBAL, CHOUARD et JACQUINOT (1964), JACQUES (1967).

Les cellules de Van Tieghem sont placées de telle façon qu'elles reçoivent perpendiculairement les rayons lumineux. L'énergie lumineuse dans les différentes régions du spectre et au niveau des cultures s'élève à 450 $\mu\text{W}/\text{cm}^2/\text{s}$, correspondant environ à un éclairage de 1 000 lux en lumière blanche. Les mesures ont été réalisées à l'aide d'une thermopile Jacobsen-Randon étalonnée à l'aide d'un pyrhillomètre étalon à disque d'argent de Abbot.

V. — *Milieux de culture expérimentaux.*

a) **Milieux de culture témoins.** — A la lumière, la croissance a été suivie sur le milieu synthétique A de Kofler cité précédemment.

— A l'obscurité, le même milieu est utilisé, additionné de glucose (5 g/l).

b) **Milieux de culture stimulateurs ou inhibiteurs.** — Pour rechercher si des corrélations existent dans le protonéma, entre les mitoses perpendiculaires responsables de la croissance en longueur des filaments et les mitoses obliques responsables de la ramification, il est nécessaire de pouvoir imposer à l'axe principal des vitesses de croissance variable. Deux méthodes sont pour cela utilisables :

— l'apport d'un inhibiteur au milieu de culture entraîne une vitesse d'allongement plus ou moins lente;

— l'addition de nouvelles substances peut conduire à des vitesses de croissance supérieures à celles obtenues habituellement sur milieu témoin.

a) **UTILISATION DE STIMULATEURS VARIÉS.** — 1° *Le glucose.* — L'utilité du sucre pour la germination des spores de Bryales est connue depuis longtemps (SERVETTAZ, 1913; VON UBISCH, 1913; ROBBINS, 1918; PRINGSHEIM et PRINGSHEIM, 1935; FRIES, 1945; KEIL, 1949; KOFLER, 1959).

Suivant le matériel employé et les concentrations utilisées, les sucres stimulent plus ou moins la croissance du protonéma (GOEBEL, 1896; ROBBINS, 1918; FRIES, 1945; IWASA, 1963; HOFFMANN, 1964; SZWEYKOWSKA, 1965). On signale cependant, dans certaines conditions, quelques rares cas d'inhibition (SERVETTAZ, 1913; KEILLOVA-KLECKOVA, 1959).

2° *L'acide traumatique*. — Le mode d'action de l'hormone de blessure est encore mal compris (THIMANN, 1948; ROSENSTOCK, 1963). Elle est connue pour activer les divisions cellulaires (ENGLISH, BONNER et SMIT, 1939) et provoquer des réactions de courbure dans le test pisum.

Cette molécule, dont l'influence n'a jamais été signalée chez les Bryales, a été utilisée dans le but de stimuler les mitoses des filaments protonématiques.

b) UTILISATION D'INHIBITEURS VARIÉS. — Les principaux inhibiteurs utilisés sont divers antimétabolites et antibiotiques.

1° *La 8-Azaguanine*, incorporée lors des synthèses nucléiques à la place de la guanine, conduit à la formation d'acides ribonucléiques anormaux. Son incorporation dans les acides désoxyribonucléiques est insignifiante (HOTTA et OSAWA, 1958). C'est donc un inhibiteur de la synthèse d'acides ribonucléiques (MANDEL, 1957, 1961; MANDEL et ALTMAN, 1960). De plus, elle altère la formation d'enzymes comme la β -galactosidase (CREASER, 1956; CHANTRENE et DEVREUX, 1960).

A la différence de la 5-FUDR, elle inhibe la croissance bidimensionnelle des fougères (HOTTA et OSAWA, 1958, 1959; RAGHAVAN, 1964; DAVIS, 1968).

2° *L'actinomycine*. — C'est un antibiotique polypeptique connu comme inhibiteur des ARN messagers (REICH, FRANKLIN, SHATKIN et TATUM, 1961; GOLDBERG et RABINOVITZ, 1962; GOLDBERG et REICH, 1962; HURWITZ, FURTH, MALAMY et ALEXANDER, 1962), des synthèses enzymatiques (POLLOCK, 1963), voire même de synthèses membranaires chez les végétaux supérieurs (BAKER et RAY, 1965).

Chez les champignons, elle agit en diminuant fortement la croissance et le pouvoir de ramification (LINDENMAYER et SCHOEN, 1967; FÈVRE, 1968).

Chez les prothalles de fougères, elle supprime toute croissance dans la deuxième dimension de l'espace (RAGHAVAN, 1965 *b*; RAGHAVAN et HENG FONG TUNG, 1967; DAVIS, 1968).

3° *La Ribonucléase*. — Le métabolisme des cellules traitées par la ribonucléase a été étudié dans les racines d'oignons et les cultures d'amibes; la protéosynthèse est arrêtée, ainsi que l'incorporation d'acides aminés non basiques dans les protéines (BOSSELER, SIX et SIMIC, 1964); on constate également une inhibition de la synthèse de l'acide ribonucléique total (BRACHET, 1954, 1955 *a*, 1956; BRIERS, THOMAS et BRACHET, 1957). L'ARN de levures, ajouté au milieu (OTA,

1964) lève l'inhibition de la synthèse des protéines provoquée par la ribonucléase.

Des expériences de BRACHET et SIX (1959) prouvent que la ribonucléase agit au niveau de l'ARN soluble qu'elle dépolymérise; les ARN des noyaux, des mitochondries, microsomes et membranes sont peu touchés. Selon BRACHET (PUISEUX-DAO, 1964), BOSSELER, SIX et SIMIC (1964), l'ARN messager cellulaire serait également très sensible à l'enzyme.

De nombreux auteurs, STICK et PLAUT (1958), DE VITRY (1962), PUISEUX-DAO (1962), observent sur les cellules géantes de *Dasycladacées* (*Acetabularia* et *Batophora*) une inhibition très nette de la croissance et de la morphogénèse.

Son action sur les Bryales n'a jamais été mentionnée. Des essais sont en cours sur la morphogénèse du prothalle de Pteridophytes (RAGHAVAN, en préparation).

VI. — *Etablissement des courbes de croissance.*

1° La longueur des filaments principaux du protonéma est mesurée toutes les 12 ou 24 heures. Des courbes individuelles sont établies, correspondant à autant d'axes différents observés.

2° Lorsque la vitesse de croissance devient constante, les courbes individuelles sont des droites aux erreurs d'expérience près.

Les longueurs de départ sont arbitrairement choisies égales à 0. Sur l'axe des abscisses, l'origine des temps est ramenée à 0.

3° Si les courbes individuelles pour un milieu donné se groupent en un faisceau, elles peuvent se résumer en une courbe moyenne générale, avec calcul de l'écart quadratique moyen par rapport à la moyenne.

VII. — *Techniques de micromanipulation.*

Pour réaliser les expériences de décapitation d'axe, un filament protonématique est repéré et suivi dans son évolution pendant plusieurs heures au microscope. Les ramifications qu'il porte sont également mesurées et les courbes de croissance sont construites pour vérifier que la phase linéaire d'allongement est bien atteinte.

L'apex considéré est détruit à l'aide d'un laser à rubis. On observe alors, grâce à de nouvelles mesures, l'effet de l'opération sur telle ou telle ramification.

Toutes les expériences de décapitation précise, d'isolement de ramifications, ont été possibles grâce à cette technique.

CHAPITRE PREMIER

QUELQUES GÉNÉRALITÉS SUR LA CROISSANCE ET LA DIFFÉRENCIATION DU PROTONÉMA

Le but essentiel de ce travail est d'étudier la ramification et le bourgeonnement du protonéma des Bryales. Mais avant de pouvoir le faire, il fallait préciser certains caractères de ce protonéma.

1° Tous les filaments protonématiques ne sont pas morphologiquement comparables. Depuis longtemps, en effet, on connaît chez certaines espèces l'existence de rhizoïdes (HEITZ, 1940; BAUER, 1942; FITTING, 1949; ANDEL, 1952; AINSWORTH, 1956; GORTON EAKIN, 1957; BOPP, 1961). Est-il possible de les faire disparaître et d'obtenir alors des cultures dépourvues de ce type de différenciation cellulaire ?

2° Le protonéma obtenu à partir de germination de spores est génétiquement variable (sauf en cas d'autofécondation pour une race pure). Pour disposer d'un chloronéma à caractères stables, il s'avère indispensable de réaliser des clones à partir de cultures monospores fréquemment repiquées. Ces cultures permettraient de travailler avec des boutures de filaments.

3° Mais une cellule protonématique isolée sera-t-elle capable de donner un protonéma à caractères identiques à celui né d'une spore ? Doit-on obligatoirement utiliser une seule cellule ? Des boutures pluricellulaires, de réalisation plus facile, conduiraient-elles aux mêmes résultats ?

4° Enfin, une spore est une cellule tout à fait particulière. N'exerce-t-elle pas une influence sur le protonéma qu'elle engendre ? Dans l'affirmative, est-il possible d'éliminer cet effet et comment ?

Nous envisagerons donc successivement les problèmes relatifs aux rhizoïdes et à leur différenciation, l'influence d'une spore, puis d'un groupe de spores sur la morphologie du protonéma et nous comparerons enfin les caractères des cultures issues soit d'une bouture de taille variable, soit d'une spore.

I. — MORPHOGENÈSE DES JEUNES GERMINATIONS DE SPORES

Nous avons réalisé la plus grande partie de nos expériences sur des protonémas obtenus à partir de spores d'espèces variées.

A. — Recherche des corrélations susceptibles d'exister entre les axes.

a) **Analyse des corrélations de croissance entre axes et rhizoïdes.** — Une spore de *Funaria hygrometrica* (Hedw.) germant à la lumière peut donner naissance à un ou plusieurs axes chlorophylliens (diamètre $20 \pm 5 \mu$) et à un filament plus grêle ($8 \pm 3 \mu$), pauvre en chloroplastes, appelé rhizoïde. Quelle est la signification de ce rhizoïde ?

1. S'agit-il d'une forme de famine, conséquence d'une carence nutritionnelle, comme le prétendent certains auteurs (BENECKE, 1903; SCHOENE, 1906; GURLITT, 1918; HEITZ, 1926; MÄGDEFRAU, 1933; FITTING, 1950; MADER, 1952 b).

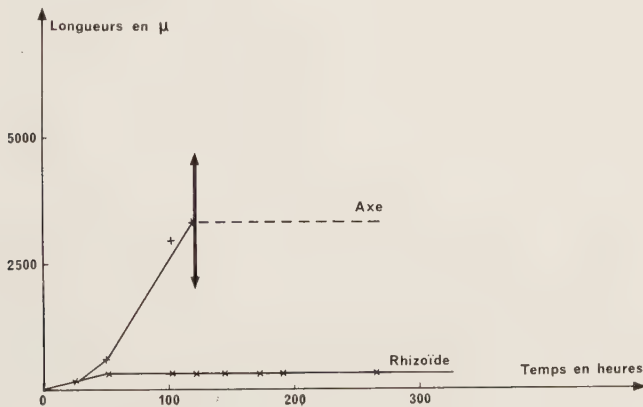
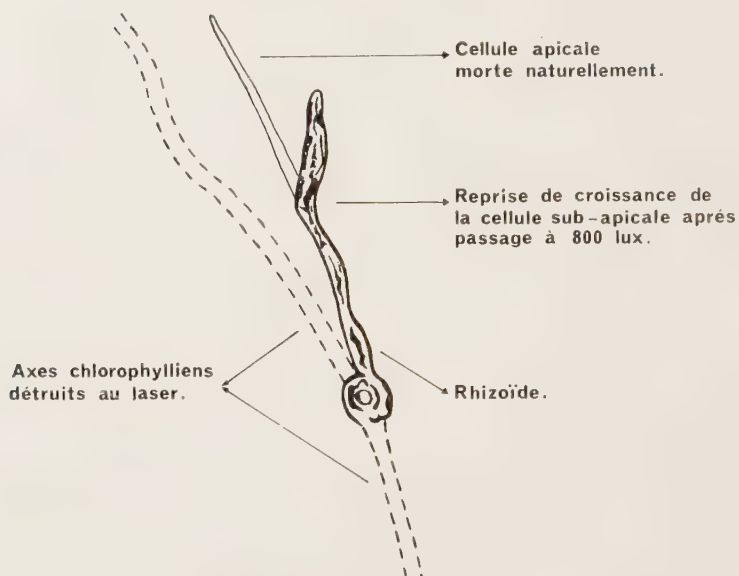


FIG. 1. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

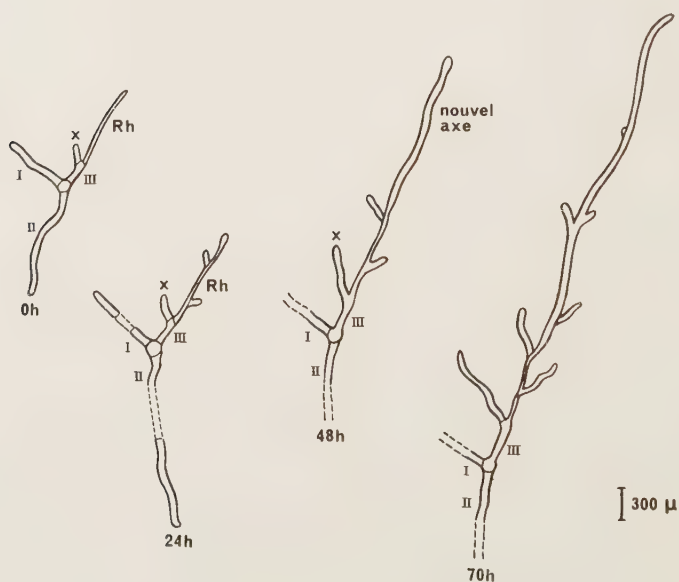
Culture à l'obscurité. Après suppression de l'axe ($\updownarrow$), le rhizoïde ne reprend pas sa croissance terminée depuis 72 heures.

2. Correspond-il à une différenciation stable liée initialement à la polarité de la spore ? Après ablation des axes, il doit conserver ses caractères morphologiques et physiologiques. Il se rapprocherait alors des rhizoïdes observés chez *Draparnaldia* après fragmentation du thalle (LARPENT, 1968) :

1° Les rhizoïdes sont des formes de carence des filaments protonématiques. A l'obscurité en absence de sucre, et à 100 lux, leur croissance est lente et limitée (fig. 1).

FIG. 2. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Un éclairage de 800 lux provoque la reprise de croissance de la cellule subapicale d'un rhizoïde dont la croissance était arrêtée.

FIG. 3. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Eclairement de 400 lux. Transformation d'un rhizoïde en axe protonématique après suppression des filaments nés de la spore.

Si les germinations en croissance à 100 lux pendant 6 jours sont ensuite exposées à des éclaircissements de 800 lux, le rhizoïde reprend son allongement.

Dans certains cas, la cellule apicale est devenue sénescente, seule la cellule subapicale est capable de dédifférenciation et donne naissance, après 72 heures, à un système protonématique (fig. 2).

2° Puisque, dans ces conditions, les expériences d'isolement ne permettent pas une reprise de l'allongement, il faut admettre que la culture prolongée en conditions défavorables a entraîné une différenciation irréversible des cellules.

3° Il y a des degrés dans la fixation des propriétés cellulaires, puisqu'à 400 lux (fig. 3) il est possible dans certains cas (2 sur 10) de faire croître à nouveau les cellules apicales des rhizoïdes.

Huit expériences sur les dix sont positives si la même opération est réalisée après passage à 800 lux.

4° De plus, à 400 lux, il faut supprimer tous les autres centres de synthèses pour que les rhizoïdes se transforment en axe. C'est donc la preuve que des corrélations d'inhibition existent entre les filaments nés de la spore.

b) Recherche des corrélations entre les axes nés d'une spore. — L'analyse des courbes de la figure 4 montre que :

1° Les axes chlorophylliens sont en phase linéaire de croissance après 27 heures de culture. Leur vitesse d'allongement devient constante et s'élève alors à 10 μ /h.

2° Si on sectionne l'un des axes, le comportement des autres n'est pas modifié (fig. 5). La durée de la phase exponentielle ainsi que la vitesse moyenne de croissance restent constantes.

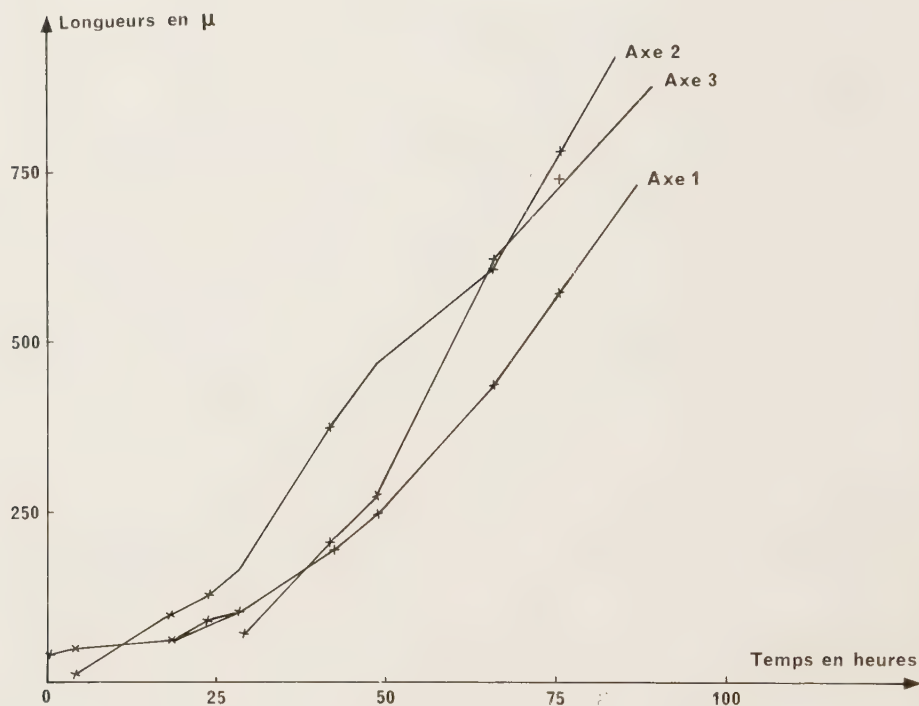
Il n'existe donc pas de relation entre les différents axes nés d'une spore. Chacun acquiert une vitesse de croissance caractéristique du milieu et des conditions de culture utilisés. Les filaments protonématiques sont physiologiquement indépendants.

On pourrait croire que la spore est sans influence sur leur devenir. Nous allons montrer qu'il n'en est pas ainsi.

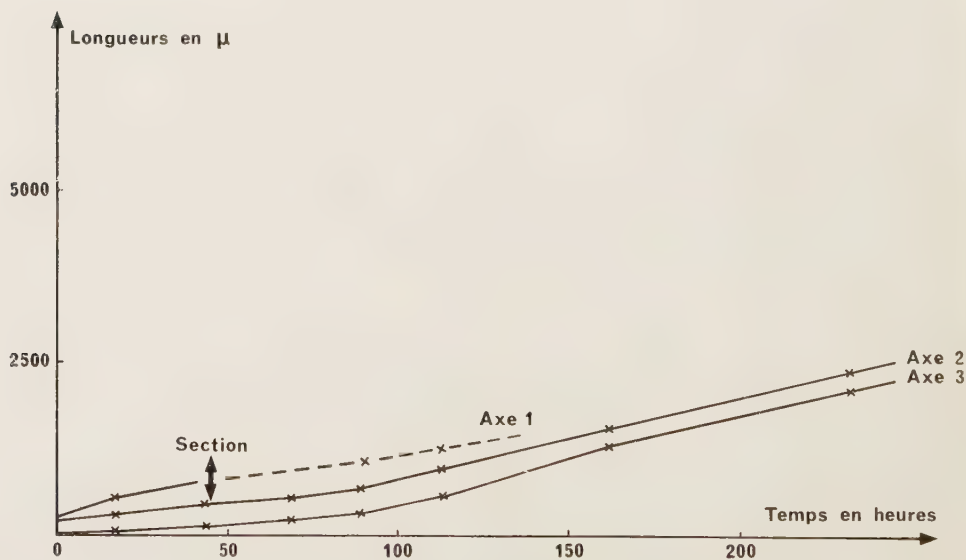
B. — Influence de la spore sur le pouvoir de ramification des axes.

a) Culture à l'obscurité. — Les observations ont été réalisées sur des germinations de *Ceratodon purpureus* et de *Funaria hygrometrica* cultivées sur milieu minéral A.

Dans ces conditions, les filaments protonématiques portent tous à leur base un nombre restreint (6 en moyenne) de ramifications localisées près de la spore, sur une distance égale environ au sixième de

FIG. 4. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Croissance comparée des axes nés d'une spore sous un éclairement de 1 000 lux.

FIG. 5. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Eclaircissement de 1 000 lux. La section de l'axe n° 1 ne modifie pas la vitesse de croissance des axes n°s 2 et 3.

la longueur totale (9 000 μ) d'un filament âgé de 14 jours (fig. 6). La partie distale (soit 5/6 de la longueur) est entièrement nue. A partir du cinquième jour de développement, les cellules proches de la spore semblent totalement vidées de leur contenu. Ce phénomène d'autolyse, signalé également par SZWEYKOWSKA (1965), assure vraisemblablement une source d'aliments organiques aux cellules en croissance. Ce phénomène est analogue à celui observé sur le thalle des champignons en croissance sur milieu de culture appauvri (LARPENT, 1966; BÜLLER, 1933).

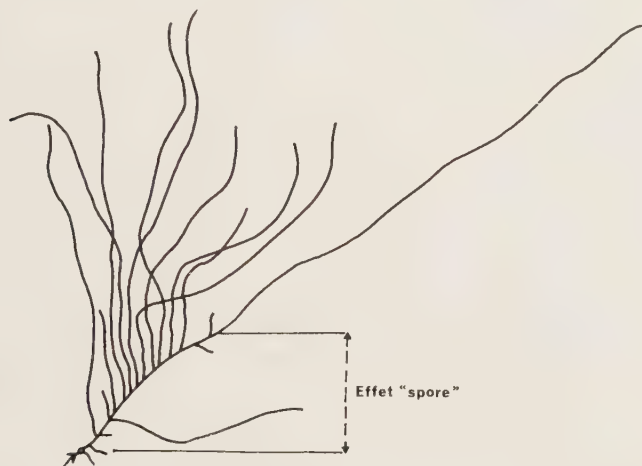


FIG. 6. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Morphologie d'une germination de 14 jours cultivée à l'obscurité.

b) Culture sous une faible intensité lumineuse. — Les axes protonématiques des germinations cultivées sous un éclairage de 400 lux sont entièrement nus jusqu'au neuvième jour de développement (environ 49 cellules). Seules existent à leur base deux ou trois ramifications dont la vitesse de croissance est comparable à celle des filaments principaux.

Au dixième jour de culture, de nouvelles ébauches apparaissent au hasard le long des axes. Les ramifications qui naîtront les jours suivants se placeront soit entre les précédentes, soit, le plus souvent, en position plus apicale, donc sur la partie la plus jeune des filaments (fig. 7). L'histogramme n° 8 résume ces résultats et illustre la discontinuité existant dans le temps, entre les deux vagues de ramifications.

c) Culture sous de fortes intensités. — Sous des éclairages de 800 à 1 200 lux, les premières ramifications apparaissent dès que le filament atteint 130 μ de longueur. Elles correspondent d'abord aux ramifications de base localisées près de la spore; mais le temps de latence les séparant d'une deuxième vague fait ici défaut, les ébauches latérales se forment régulièrement.

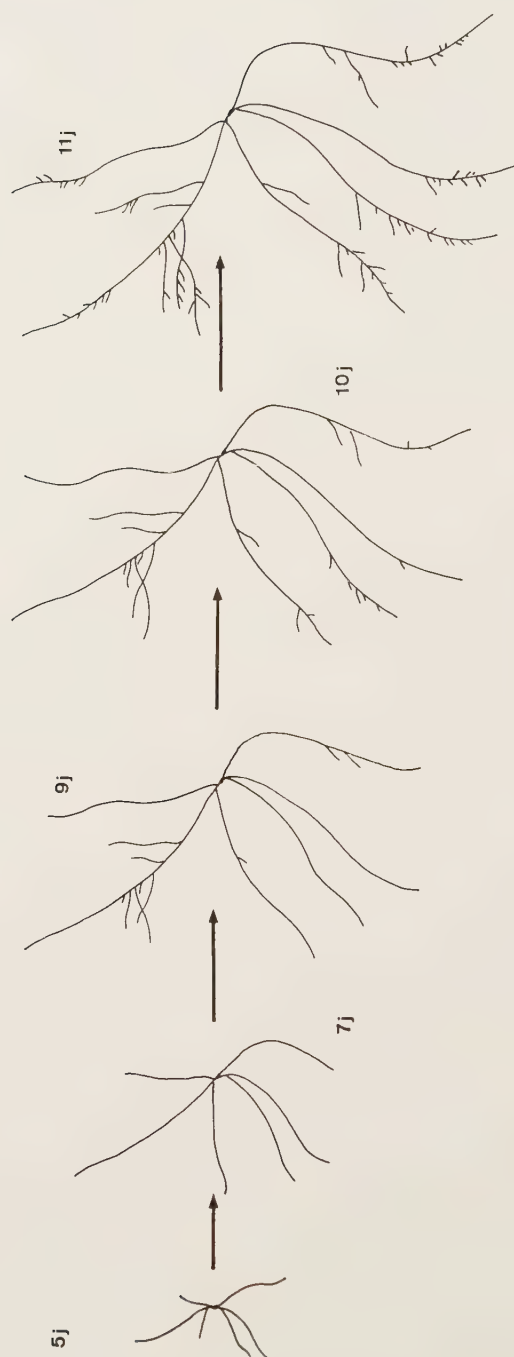


Fig. 7. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 400 lux. Morphologie du protonéma. Schéma représentant le mode d'apparition des ramifications :

a) de 0 à 7 jours : première vague de ramifications (effet spore) ;

b) de 7 à 11 jours : apparition de la deuxième vague (✓) de ramifications

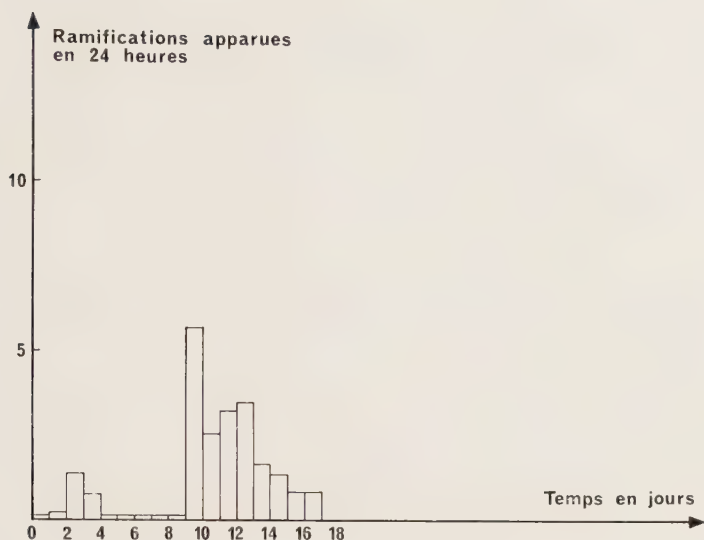


FIG. 8. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 400 lux Rythme d'apparition des ramifications sur un protonéma. Mise en évidence d'un temps de latence de 6 jours séparant les deux vagues d'apparition des ramifications.

Discussion. — 1° La spore apporte un facteur de ramification qui permet à l'obscurité l'apparition de quelques ébauches latérales.

2° Ce facteur s'épuise rapidement, et, à 400 lux, il faut alors 10 jours pour que les axes protonématiques deviennent à nouveau capables d'engendrer des ébauches latérales. Au contraire, à 800 et 1 200 lux, le facteur est rapidement synthétisé et la formation des rameaux latéraux est régulière et continue.

3° L'existence de ce facteur de ramification, amené par la spore, est confirmée par les expériences de microchirurgie réalisées sur les jeunes germinations, en effet des axes nus isolés continuent à s'allonger sans se ramifier.

Les spores sont donc capables de modifier la morphogenèse du jeune protonéma.

Connaissant ce résultat, on peut se demander si une culture monospore est ou non comparable à une culture née d'un ensemencement massif.

Chez de nombreuses espèces, on remarque très souvent une croissance meilleure en présence d'un semis abondant (GAUSE, 1931; THOMPSON, 1941; KOFLER, 1959 *b*). L'importance de l'effet de groupe est bien connue chez les champignons (STADLER, 1952; TABER, 1957; DARLING, 1959; JOLY, 1967) et dans les cultures de cellules isolées (REINERT, 1965; STEWARD, 1958, 1967).

C. — *Influence de l'inoculum (nombre de spores)
sur la croissance du protonéma.*

a) A l'obscurité, la croissance simultanée de plusieurs germinations ne modifie pas la vitesse d'allongement (fig. 9). Au contraire, à la lumière, c'est une stimulation générale et réciproque que l'on observe (fig. 10).

b) A l'obscurité, les variations de la vitesse de croissance sont diminuées si les spores ensemencées sont nombreuses : chaque spore appor-

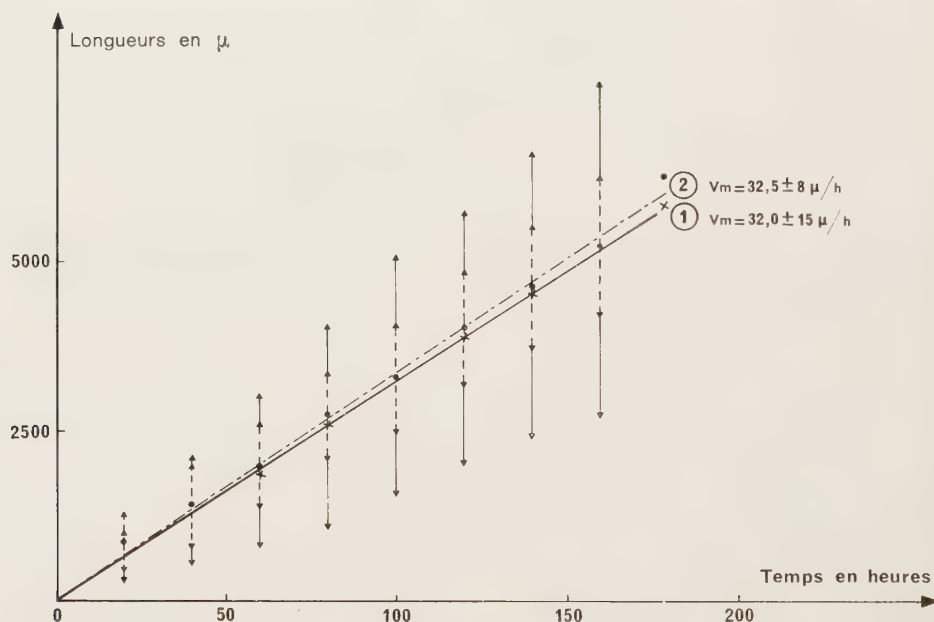


FIG. 9. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Croissance comparée à l'obscurité du protonéma issu
soit d'une culture monospore (1), soit d'une culture polyspore (2).

terait des éléments qui permettraient à chacun des filaments d'atteindre le développement autorisé par les conditions du milieu (fig. 11). A la lumière, les écarts-types restent faibles, car les axes protonématiques atteignent très rapidement la vitesse de croissance caractéristique des conditions de culture.

c) Pour que des résultats soient facilement comparables, il est indispensable que les inoculums soient monospores : les phénomènes d'antagonisme ou de synergie sont alors éliminés.

Les spores représentent un matériel hétérogène défavorable à l'étude de mécanismes physiologiques ou morphogénétiques précis. Il était alors nécessaire de pouvoir multiplier végétativement le proto-

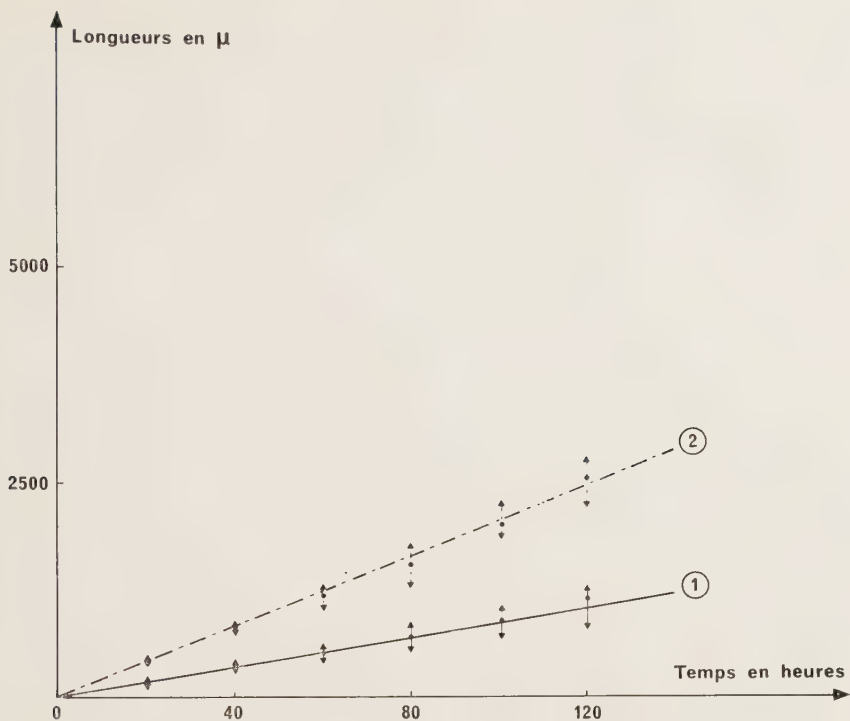


FIG. 10. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Croissance comparée, sous un éclairement de 800 lux, du protonéma issu soit :
1° d'une culture monospore; 2° d'une culture polyspore.

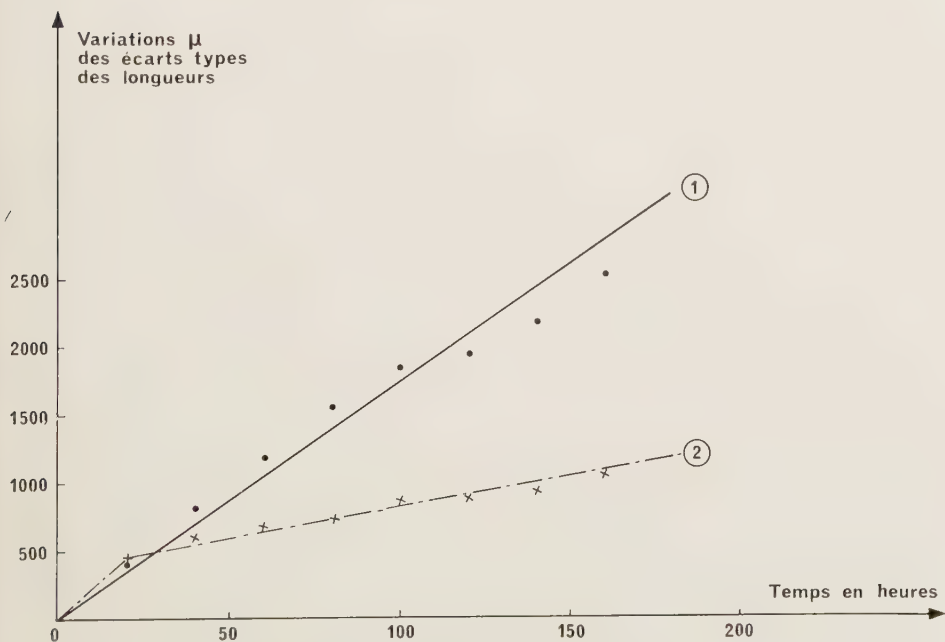


FIG. 11. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Variations des écarts types en fonction du temps sur une :
1° culture monospore; 2° culture polyspore, à l'obscurité.

néma issu d'une seule spore. Le clone ainsi obtenu permettait d'expérimenter indéfiniment sur un matériel homogène. Mais il faut auparavant démontrer que le protonéma issu d'une ou de plusieurs cellules banales possède bien les qualités que nous attendons de lui.

II. — ÉTUDES DES CARACTÈRES ORIGINAUX DES BOUTURES DE FILAMENTS PROTONÉMATIQUES

A. — *Etude de la régénération.*

Cette étude a été faite principalement sur *Leptobryum pyriforme* (Hedw.), mais les conclusions obtenues sont généralisables aux autres espèces utilisées dans nos expériences.

Des boutures de protonéma de *Leptobryum pyriforme* sont prélevées sur la frange d'une colonie mère développée à la lumière. Les implants sont « calibrés » à l'aide d'un laser à rubis.

On isole ainsi deux séries de boutures différentes par la taille (fig. 12 A) :

— Série I : boutures unicellulaires parmi lesquelles on distinguera des cellules apicales isolées, et des cellules intercalaires.

— Série II : boutures pluricellulaires (6 cellules) : une partie d'entre elles garderont la cellule apicale intacte; chez d'autres, l'apex sera détruit, seules seront gardées les cellules intercalaires.

Les cultures se développent à 23°, sous un éclairage de 800 lux.

Les résultats obtenus sur les boutures de protonéma montrent :

1° L'existence d'une polarité cellulaire très nettement marquée au niveau de la cellule apicale (fig. 12 Bc). Celle-ci se divise préférentiellement dans un plan perpendiculaire à son axe de symétrie. Les régénérats distaux sont relativement rares. La cellule s'allonge par le pôle apical.

2° L'action des traumatismes, qui se traduit par un temps de latence différent pour la reprise de croissance des boutures pluricellulaires et unicellulaires. L'effet de blessure stimule la division des cellules.

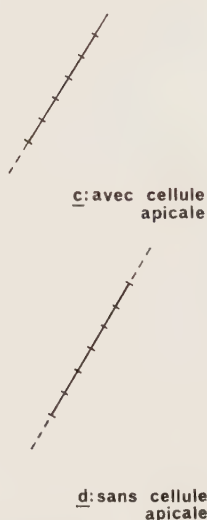
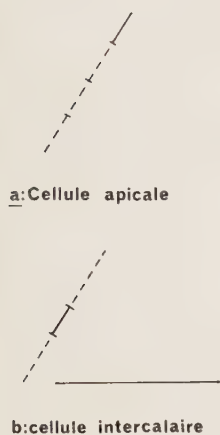
3° La présence de *corrélations d'inhibition intracellulaires* : en effet, sur un protonéma intact, les cellules apicales se divisent uniquement dans le plan perpendiculaire à leur axe de symétrie; elles ne portent jamais de ramification. Isolées, elles acquièrent parfois cette potentialité, mais l'ébauche formée est le plus loin possible de l'apex (pôle distal).

4° L'existence de *corrélations d'inhibition intercellulaires* : une cellule intercalaire isolée régénère deux filaments, six cellules intercalaires régénèrent seulement sept filaments au lieu de douze. Une concurrence s'établit donc entre les cellules (fig. 12 Bd).

A

Boutures unicellulaires

Boutures pluricellulaires



B



FIG. 12. — *Leptobryum pyriforme* Hedw. (Schpr.).

A. Divers types de boutures réalisés. B. Divers types de régénération observés.
Les cellules en pointillé ont été détruites à l'aide du laser.

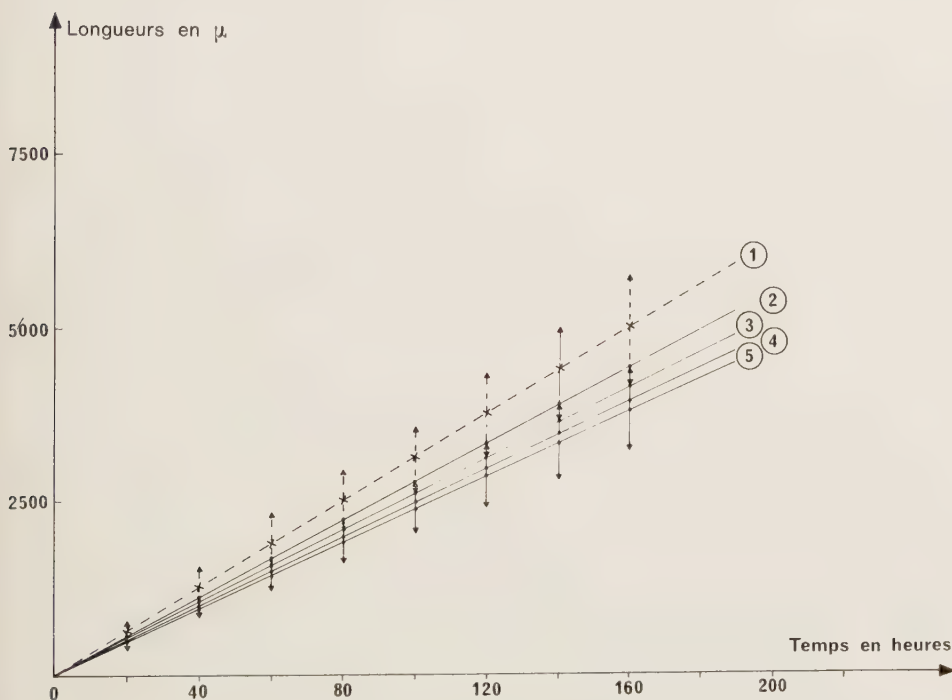


FIG. 13. — *Leptobryum pyriforme* Hedw. (Schpr.).

Eclairement de 800 lux. Vitesses de croissance comparées de protonéma issu soit :
1° d'une spore; 2° d'une bouture apicale unicellulaire; 3° d'une bouture apicale pluricellulaire; 4° d'une bouture intercalaire pluricellulaire; 5° d'une bouture intercalaire unicellulaire.

B. — *Etude de la morphologie comparée
des protonémas issus de spores ou de boutures.*

a) Les boutures donnent naissance à un protonéma strictement comparable à celui issu de germinations de spores : vitesse de croissance et pouvoir de ramification sont semblables (fig. 13).

b) L'utilisation de boutures permettra donc à l'avenir d'éliminer les facteurs d'hétérogénéité existant chez les spores (présence simultanée d'axe et de rhizoïde, effet spore, synergisme, etc.).

c) L'action de substances chimiques actives sur la ramification et la vitesse de croissance du protonéma pourra être étudiée sans interférence possible avec leur effet sur la germination des spores proprement dite.

CHAPITRE II

MISE EN ÉVIDENCE DE CORRÉLATIONS D'INHIBITION DANS LE PROTONÉMA DES BRYALES

Les observations de PRINGSHEIM semblent montrer que des corrélations d'inhibition pourraient exister dans le protonéma des Bryales. Aucune expérimentation ne permet toutefois d'affirmer l'existence d'une dominance apicale répondant aux critères que nous avons définis.

Nous étudierons successivement les caractères de la croissance du protonéma à la lumière, puis à l'obscurité.

I. — ABSENCE DE CORRÉLATIONS DE CROISSANCE ENTRE LES AXES DU PROTONÉMA DE QUELQUES BRYALES CULTIVÉES A LA LUMIÈRE (1 200 lux)

Le rôle de la lumière sur la morphologie du protonéma a été souligné très tôt par de nombreux auteurs (VON UBISCH, 1913; ROBBINS, 1918; PRINGSHEIM et PRINGSHEIM, 1935; KEIL, 1949). Ces résultats restent encore discutés.

L'espèce étudiée dans nos expériences est *Funaria hygrometrica* (Hedw.), cultivée sous un éclairage de 1 200 lux.

A. — *Analyse de la croissance du protonéma de Funaria hygrometrica (Hedw.).*

Pour éliminer toutes causes d'erreur dans l'interprétation des résultats, les observations sont faites lorsque les axes ont atteint une vitesse d'allongement constante (chap. I).

a) *Etude comparée de la vitesse de croissance des axes et des ramifications.*
— La figure 14 permet de comparer la croissance d'un axe et celle des ramifications qu'il porte. Toutes les ébauches latérales formées se

développent et leur vitesse d'allongement est la même que celle de l'axe principal. Il n'y a donc aucune préséance de ce dernier.

Il arrive même fréquemment qu'une ramification croisse plus vite que l'axe (fig. 14). Sur une colonie de 8 jours, axes et ramifications se confondent. De même, les ramifications de premier ordre n'exercent aucune préséance sur celles de deuxième ordre.

Chez les champignons, l'hyphe principale garde toujours la pré-

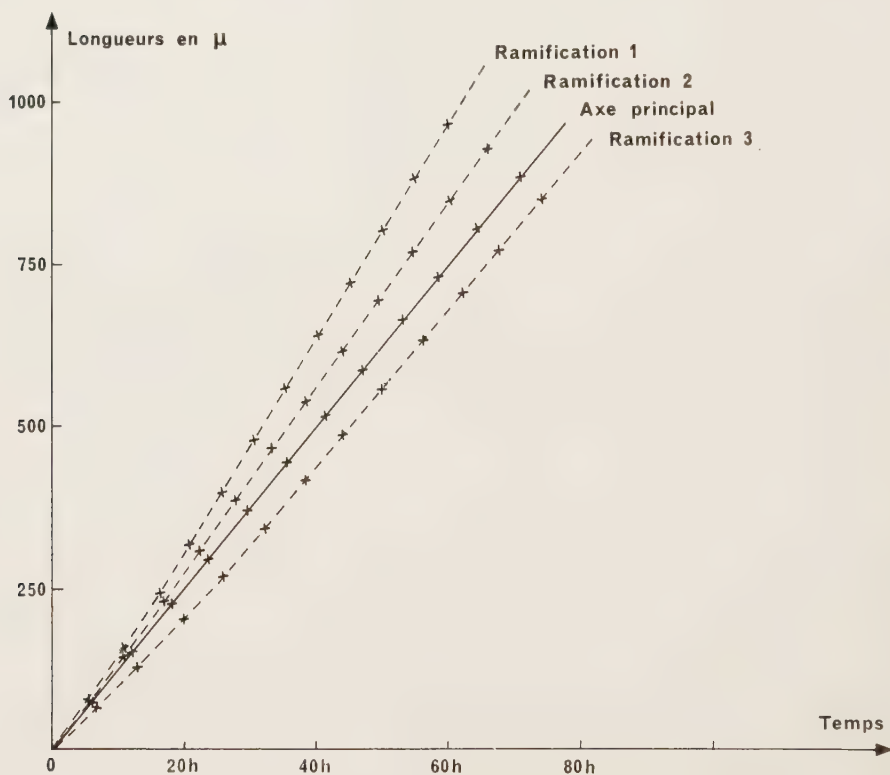


FIG. 14. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à 1 200 lux.

Croissance comparée de l'axe principal et de trois de ses ramifications.

séance sur les rameaux latéraux, même si ces derniers s'allongent à la même vitesse. Il existe toujours une proportion plus ou moins grande (20 % pour le *Neurospora crassa*, 30 à 40 % pour le *Rhizoctonia solani* ou le *Saprolegnia monoïca*) d'ébauches latérales qui ne se développent pas. Il est donc possible de définir une dominance résiduelle, l'absence de toute corrélation d'inhibition se traduisant par 100 % de rameaux en croissance rapide et continue. Cependant, chez certains mutants du *Podospora anserina* (LARPENT, non publié), l'axe principal se distingue très difficilement et ses ramifications se développent parfois plus rapidement que lui.

b) **Expériences de décapitation.** — Seules les cellules apicales du filament et des ébauches latérales sont le siège de la croissance en longueur. La suppression de l'apex n'influe en rien sur la vitesse d'allongement des ramifications (fig. 15). Quinze heures environ après l'ablation, un axe néoformé de remplacement prend naissance sous la blessure. Ce nouveau filament acquiert dès son apparition une vitesse comparable à celle de l'axe opéré.

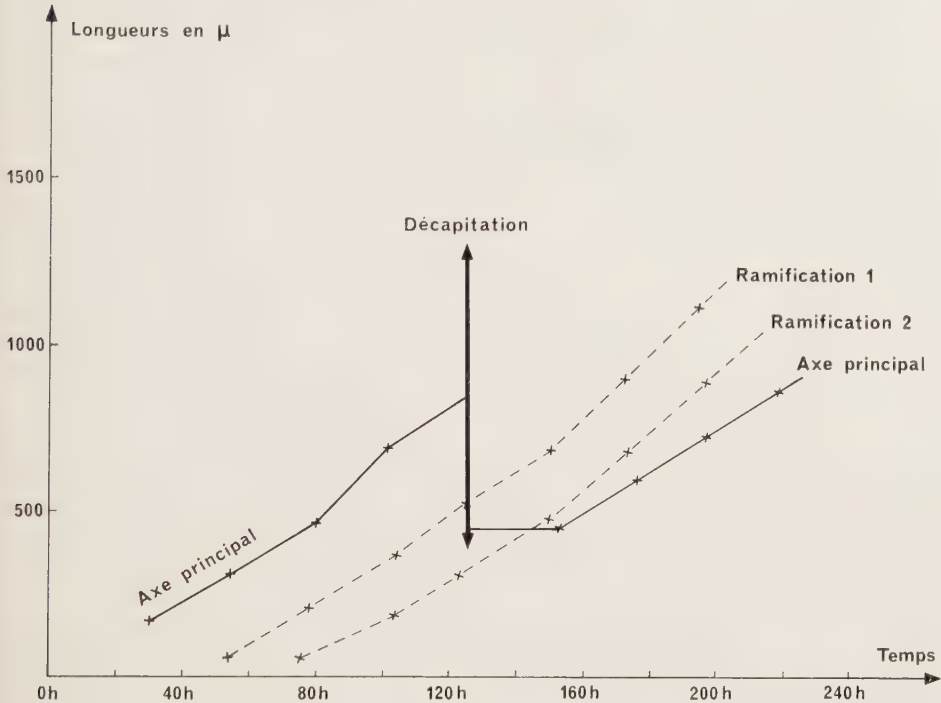


FIG. 15. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Effet de la décapitation de l'axe principal sur la croissance des ramifications qu'il porte.

A la lumière (1 200 lux), dans des conditions de culture permettant un développement considéré comme optimal, le chloronéma de Funaire est dépourvu de toute dominance apicale.

Pour savoir si ces résultats ont une signification générale, nous avons étudié, avec les mêmes techniques d'autres espèces de Bryales.

B. — Comportement d'autres espèces de Bryales.

Trois espèces ont été surtout étudiées :

- *Ceratodon purpureus* Brid.;
- *Leptobryum pyriforme* Hedw. Schpr.;
- *Bryum argenteum* Hedw.

a) **Etude des vitesses de croissance comparées des axes et de leurs ramifications.** — Des caractères communs peuvent être dégagés : toutes les ramifications de premier ou second ordre ont le même comportement. Leur croissance est aussi rapide que celle de l'axe qui les porte. Toute préséance de l'axe principal est absente.

b) **Expériences de décapitation.** — Les expériences de décapitation seront faites uniquement sur *Ceratodon purpureus* qui s'est révélé être un matériel expérimental donnant des résultats aisément reproductibles.

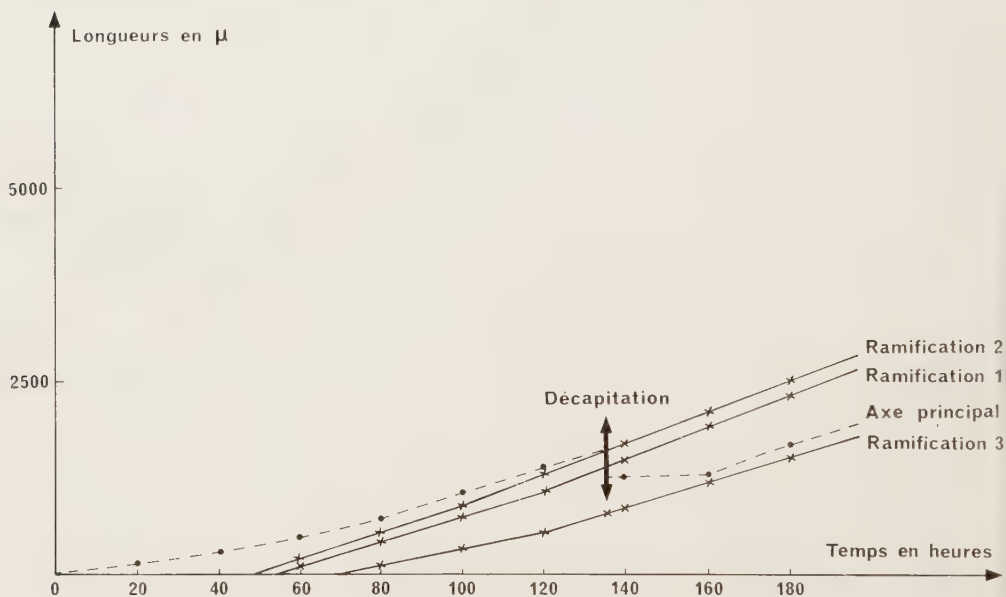


FIG. 16. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).
Culture à 1 200 lux. La décapitation de l'axe principal est sans effet sur la croissance des ramifications.

La figure 16 montre que l'axe principal régénère 20 heures après l'opération. La vitesse d'allongement des ramifications n'est pas modifiée après l'ablation. Tous les rameaux latéraux conservent leur rythme de croissance.

Conclusions. — 1° La dominance apicale répondant aux critères définis pour les plantes supérieures (CHAMPAGNAT, 1965), et mise en évidence dans certaines conditions chez les champignons (LARPENT, 1966), n'a pu être retrouvée dans le protonéma des Bryales.

2° Chez les espèces étudiées, toutes les ébauches latérales s'allongent à la même vitesse que l'axe principal et toute ablation de l'apex principal reste inefficace.

3° Chez les plantes supérieures, la dominance apicale est renforcée par des carences diverses (GREGORY et VEALE, 1957). De même, le thalle jeune des champignons, système de filaments ramifiés, présente des corrélations d'inhibition liées à la nutrition. Les préséances y sont exagérées par des carences diverses.

Chez le *Rhizoctonia solani*, carencé en azote, les ébauches latérales se forment mais restent inhibées; la proportion de rameaux en croissance diminue si la dominance apicale augmente.

Chez le *Saprolegnia*, au contraire, les ramifications disparaissent complètement, les axes se dénudent progressivement.

Il était logique de tenter, par les mêmes procédés, de mettre en évidence l'existence possible d'un système de corrélations dans le protonéma de Bryales. Le moyen le plus simple consistait à supprimer la photosynthèse.

II. — MISE EN ÉVIDENCE DE CORRÉLATIONS D'INHIBITION DANS LE PROTONÉMA DE BRYALES CULTIVÉ A L'OBSCURITÉ

Nous décrirons successivement les expériences réalisées sur *Ceratodon purpureus*, puis sur *Funaria hygrometrica*.

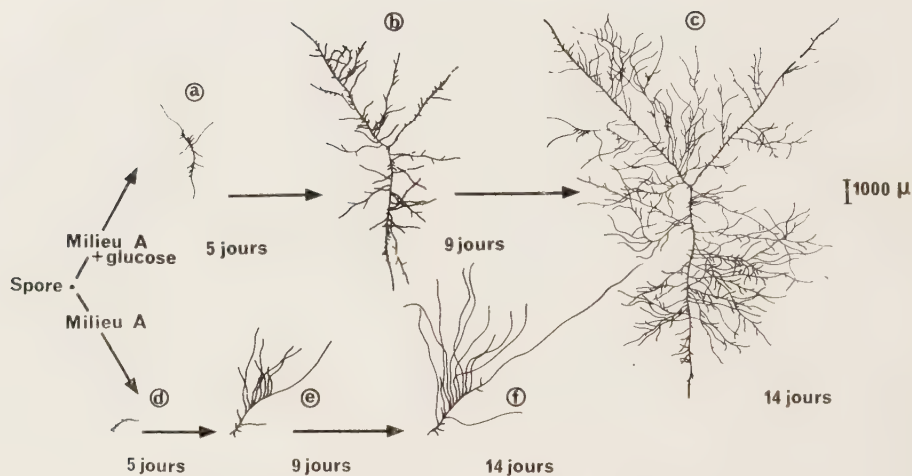
A. — *Analyse de la croissance du protonéma de Ceratodon purpureus (Brid.).*

a) **Culture sur milieu minéral.** — Comme nous l'avons déjà précisé dans le chapitre I, le protonéma se présente sous la forme de très longs filaments nus, portant à leur base un nombre restreint de ramifications (fig. 17, d, e, f).

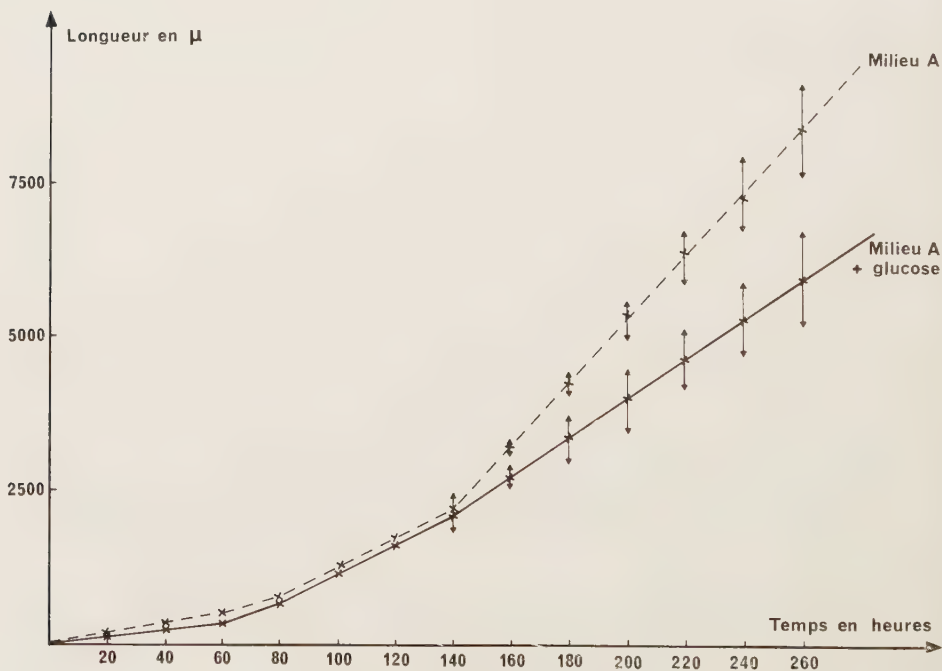
Ce comportement n'est pas sans rappeler celui du *Saprolegnia monoïca* carencé en azote ou en soufre (LARPENT, 1966).

A partir du cinquième jour de culture environ, la vitesse de croissance se maintient constante durant toute la durée de l'expérience et est égale à $43 \pm 5 \mu/h$.

b) **Croissance sur milieu minéral glucosé.** — La présence de glucose dans le milieu fait apparaître de très nombreuses ramifications sur toute la longueur des filaments (fig. 17, a, b, c). La vitesse de croissance des axes principaux est inhibée de 30 %, et passe de $43 \pm 5 \mu/h$ à $31 \pm 5 \mu/h$ (fig. 18). Les ramifications ont une vitesse d'allongement ($24 \pm 8 \mu/h$) comparable à celle des axes qui les portent ($31 \pm 5 \mu/h$) (fig. 19).

FIG. 17. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité. Morphologie des germinations :
sur milieu minéral glucosé (a, b c); sur milieu minéral sans glucose (d, e, f).

FIG. 18. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité. Croissance comparée des axes principaux
sur milieu minéral et sur milieu minéral glucosé.

Cependant, 49 % des rameaux formés s'arrêtent de croître et restent à l'état d'ébauches : il subsiste donc une dominance apicale résiduelle analogue à celle décrite chez les champignons. Le pourcentage d'ébauches inhibées est fonction de la concentration en sucre.

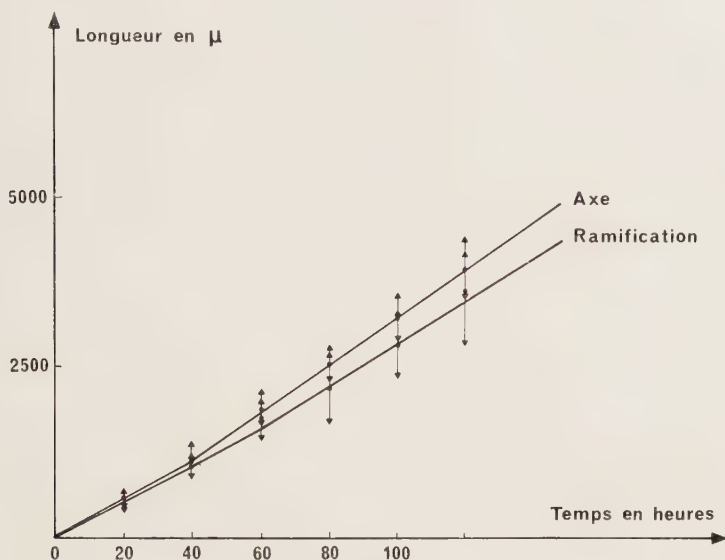


FIG. 19. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture sur milieu minéral glucosé (5 g/l) à l'obscurité.
Croissance comparée des axes et des ramifications non inhibées.

B. — Analyse de la croissance du protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Que le milieu soit ou non enrichi en glucose, le protonéma se développe en donnant de longs filaments nus dépourvus totalement, ou presque, de ramifications, dont la morphologie est celle décrite dans le chapitre précédent.

La croissance des axes principaux est plus rapide qu'à la lumière. Leur vitesse est multipliée par 5 et passe de 13 à 61 μ /h.

Conclusions. — 1° L'absence de lumière conduit :

- soit à une dominance totale si le milieu est dépourvu de glucose;
- soit à une dominance apicale résiduelle si le milieu renferme du glucose; comme chez les champignons, elle est mesurable par un pourcentage de rameaux inhibés. Le *Ceratodon* se rapproche plus spécialement du type *Saprolegnia*, qui peut se dénuder totalement dans des conditions défavorables.

2° La présence de l'axe principal sur les ramifications qu'il porte

peut être renforcée ou diminuée en modifiant les conditions de culture.

3° Le Ceratodon et la Funaire ont donc un comportement différent à l'obscurité quand ils sont cultivés sur milieu minéral sucré. Alors que pour le Ceratodon, le glucose rétablit la ramification, il demeure sans action dans le cas de la Funaire.

Une dominance apicale est donc décelable dans le protonéma; elle serait totale dans certains cas (filaments nus), ou partielle le plus souvent (pourcentage d'ébauches avortées). Rien n'indique pourtant que cette dominance soit corrélative et qu'elle réponde au deuxième critère défini chez les plantes supérieures et les champignons : la suppression de l'organe dominant amène le développement ou l'accélération de croissance des organes dominés.

C. — *Nature corrélative de la dominance apicale.*

Si l'apex est l'organe dominant, son ablation doit amener le développement des organes dominés.

Les expériences ont été réalisées sur la Funaire et le Ceratodon.

a) *Mise en évidence de la préséance de l'apex principal.* — Un filament de 7 000 μ de long est décapité environ à 200 μ au-dessus des dernières ébauches inhibées: 28 heures après l'opération, elles reprennent leur développement (fig. 20) : la dominance apicale a été levée.

40 heures plus tard environ, un axe néoformé apparaît; il prend naissance au-dessous de la membrane de cicatrisation.

Souvent, la levée d'inhibition consécutive à l'opération est provisoire : la préséance de l'axe se rétablit par l'intermédiaire du filament néoformé qui apparaît environ 24 heures après l'opération (fig. 21). La ramification latérale ne reste donc soustraite à l'inhibition que pendant une période de 80 heures environ, puis perd à nouveau son indépendance. Si par une deuxième décapitation on supprime le régénérat apical, on assiste à une nouvelle reprise de croissance du rameau latéral (fig. 21).

Cette réponse est différente de celle observée chez les végétaux supérieurs (WENT-THIMANN, 1937) et chez les champignons (LARPENT, 1966) où une nouvelle dominance apicale s'établit très difficilement sur des ébauches soustraites temporairement à son action.

b) *Observations et expériences prouvant l'existence de compétitions entre les ramifications.* — Pour démontrer qu'il existe une concurrence entre les rameaux en croissance, nous réalisons l'expérience décrite par la figure 22.

On décapite un filament principal porteur d'une ramification R_1 dont la croissance est arrêtée depuis 100 heures environ; 34 heures après l'opération, R_1 reprend son développement en même temps

qu'apparaissent deux nouvelles ébauches, R_2 et R_3 . 38 heures plus tard, R_2 s'arrête. R_1 n'ayant repris sa croissance qu'à une vitesse faible ($2,5 \mu/h$ contre $30,5 \mu/h$ pour R_3 nouvellement apparue; 46 heures plus tard, R_1 s'arrête et seule R_2 continue sa croissance.

c) **Observations et expériences prouvant l'existence de compétition entre les ramifications et l'apex principal.** — Pour démontrer que les rameaux basitones ont la même valeur que l'apex principal et qu'ils jouent le

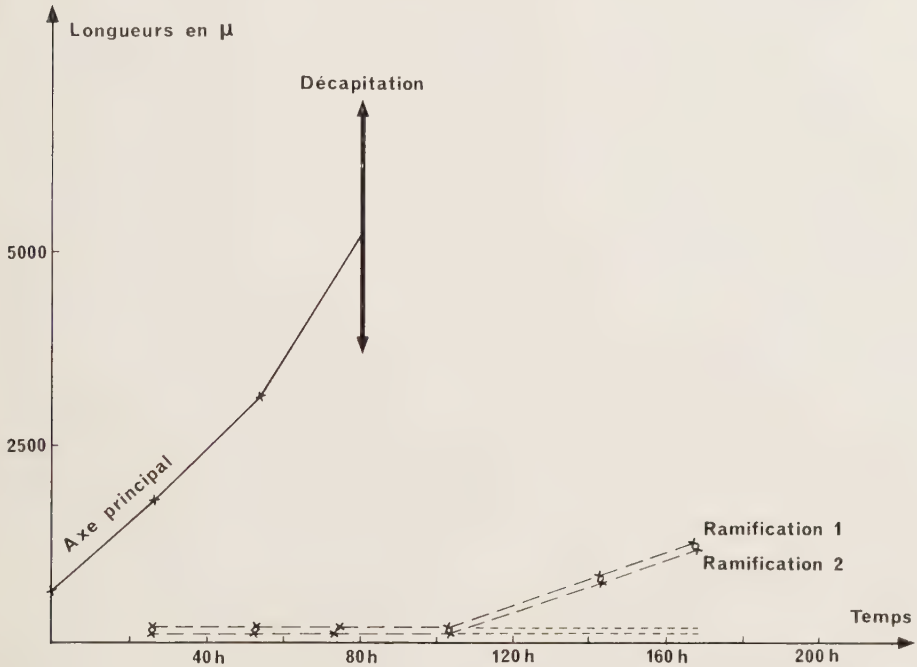


FIG. 20. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Croissance à l'obscurité.

Effet de la décapitation d'un axe dominant sur la croissance des ramifications.

même rôle dans les corrélations d'inhibition, nous réalisons l'expérience résumée dans la figure 23.

L'axe principal et sa ramification R_3 cessent spontanément toute évolution après 70 heures de croissance pour l'un et 120 heures pour l'autre.

Après 140 heures de culture, quatre ramifications : R_1 , R_2 , R_4 , R_5 , sont supprimées. 26 heures après l'opération l'axe reprend son développement mais entre en concurrence avec R_3 qui, elle aussi, s'allonge de nouveau. R_3 arrive à prendre alors la préséance sur l'apex principal. 400 heures plus tard, le sommet de R_3 est détruit à son tour; l'axe ne reprend pas son développement. C'est une ébauche latérale du filament régénéré après la première intervention, qui prend le relais et devient un véritable axe de remplacement.

Ce phénomène peut se comprendre si l'on pense que la cellule apicale est devenue sénescence. Chez le *Draparnaldia mutabilis*, on sait que les cellules apicales des rhizoïdes subissent une différenciation cellulaire qui les rend incapables de poursuivre un développement, même après isolement (LARPENT, 1968). De même, chez les champignons du type *Podospora anserina*, les hyphes devenues sénescences ne reprennent plus leur croissance après un repiquage (MARCOU, 1961).

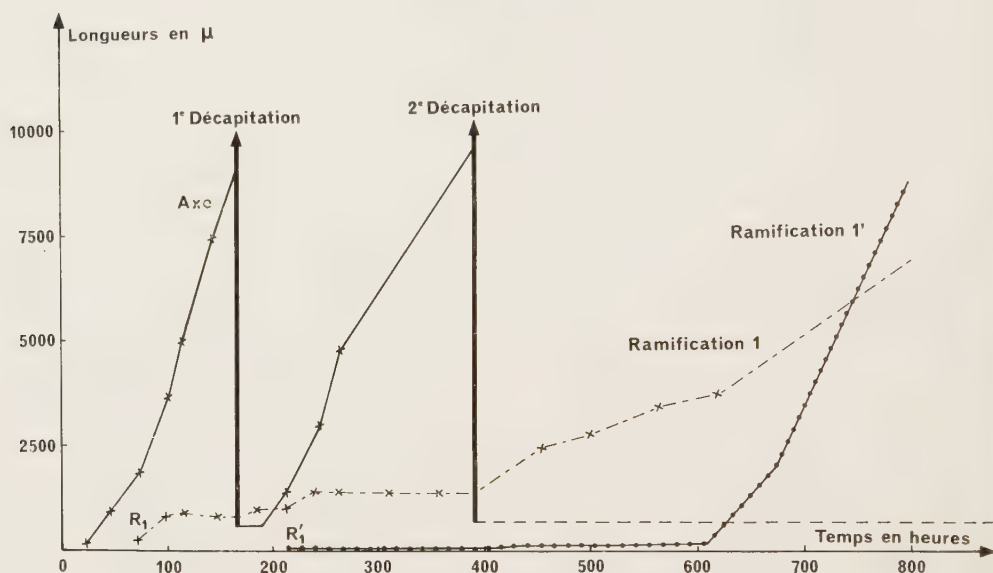


FIG. 21. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à l'obscurité âgée de 34 jours. Action de décapitations successives sur la croissance des ramifications.

Au temps t : 164 heures, décapitation de l'axe principal. Reprise de croissance de la ramification R_1 .

Au temps t : 392 heures, décapitation du régénérat.

La ramification R_1 , dominée par le régénérat, reprend à nouveau son développement. A 600 heures, une ramification R'_1 apparaît sur R_1 et acquiert une vitesse de croissance très élevée.

Conclusions. — En fonction du milieu et des conditions de culture, il est possible de démontrer l'existence, dans le protonéma des Bryales, de corrélations d'inhibition entre axes et ramifications, qui répondent partiellement aux critères de la dominance apicale décrite chez les végétaux supérieurs et les champignons.

Comme chez eux, elle se manifeste par :

— une reprise de la croissance des ramifications restées à l'état d'ébauches, après ablation du sommet principal;

— la régénération d'un axe principal qui tend à se reconstituer identique à lui-même;

— une disparition totale des organes dominés si la dominance

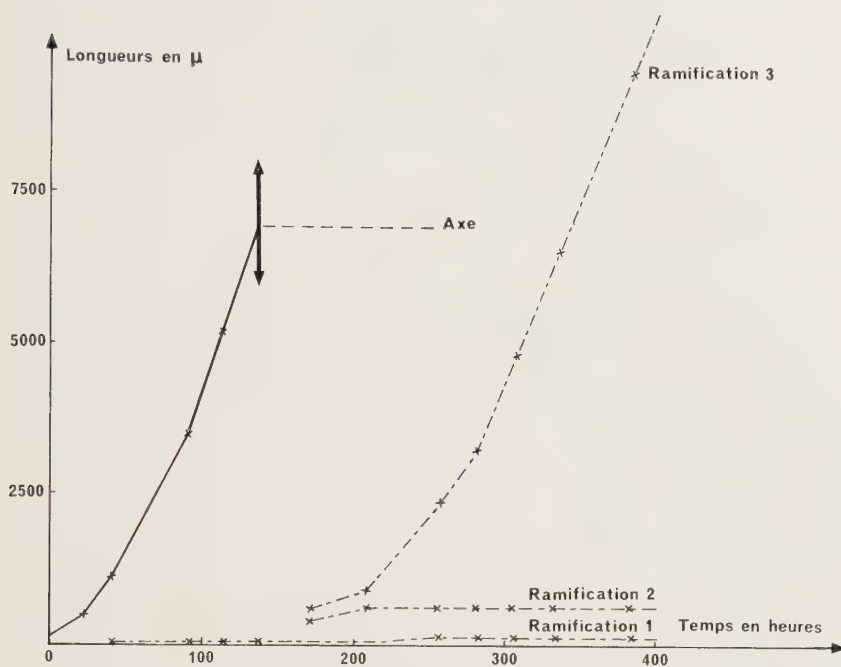


FIG. 22. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).
Culture âgée de 26 jours à l'obscurité.
Mise en évidence de phénomènes de compétition
entre les ramifications latérales (voir texte).

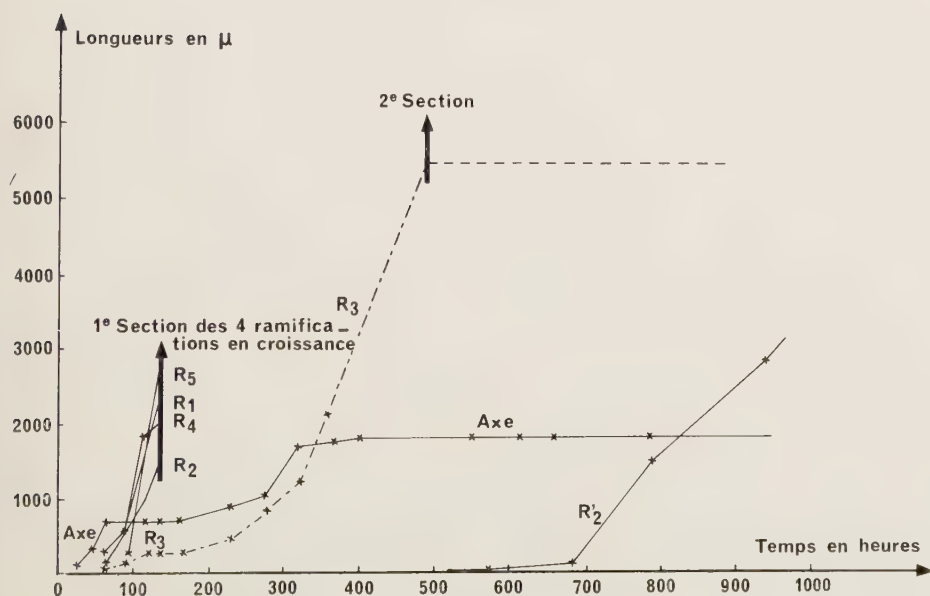


FIG. 23. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).
Culture âgée de 42 jours à l'obscurité.
Mise en évidence de corrélations d'inhibition entre axes et ramifications (voir texte).

apicale devient parfaite (culture à l'obscurité). La croissance continue de l'axe principal peut être opposée à l'arrêt précoce des ramifications qu'il porte, et à la suppression totale des jeunes ébauches.

La lumière agit donc à la fois sur la naissance et sur la croissance des ramifications.

Mais contrairement aux végétaux supérieurs et aux champignons :

— la préséance de l'apex principal se rétablit sur les rameaux ayant repris leur croissance par l'intermédiaire du nouvel axe néo-formé;

— lorsqu'il subsiste une dominance apicale résiduelle, il existe deux sortes de rameaux latéraux : les uns, semblables aux axes, ont la même vitesse de croissance qu'eux, les autres restent à l'état de rameaux courts et cessent très tôt leur développement; mais aucune ramification ne maintient une croissance durable à une vitesse très inférieure à celle de l'axe d'ordre un.

CHAPITRE III

DÉFINITION ET ÉVOLUTION DES PARAMÈTRES DE LA CROISSANCE

Chez les champignons, les cloisons transversales n'existant souvent pas, le pouvoir de ramification s'exprime par le nombre d'ébauches latérales par unité de longueur d'axe principal. La distance entre deux rameaux latéraux et le pourcentage de ramifications inhibées permettent alors de donner une mesure exacte de la dominance apicale (LARPENT, 1966).

Chez les Bryales, les phénomènes de corrélation sont difficiles à définir dans les mêmes termes. Le protonéma chlorophyllien est soumis à l'étiollement qui peut masquer les corrélations elles-mêmes en modifiant la vitesse de croissance des axes. Il est donc nécessaire de définir au départ divers paramètres de la morphogenèse : la longueur moyenne des cellules, le rythme des mitoses, la vitesse de croissance des axes, la densité de ramification (rapport R/N), la distance séparant le sommet et la première ramification.

I. — DÉFINITION DES DIVERS PARAMÈTRES DE LA CROISSANCE ET DE LA RAMIFICATION

A. — *La croissance en longueur.*

Elle résulte de la variation de deux facteurs :

1° la longueur moyenne des cellules; 2° le nombre de cellules formées pendant un temps donné (l'unité choisie est en général 24 heures) le long des axes : *rythme des mitoses*. Ce dernier rend compte seulement d'une partie des divisions cellulaires s'effectuant réellement au niveau d'un filament : celles dont le plan, marqué par la nouvelle membrane, est perpendiculaire à l'axe en croissance.

B. — *La ramification.*

Dire qu'une cellule se ramifie, c'est dire qu'elle s'est divisée au moins deux fois alors que celle d'un filament nu n'a subi qu'une seule mitose.

De plus, cette division supplémentaire revêt un caractère particulier du fait de son orientation oblique par rapport à l'axe principal. Si la plaque équatoriale est perpendiculaire à l'axe, elle traduit une croissance intercalaire. Cette dernière n'existe en fait que très rarement : 5 % chez *Ceratodon purpureus* (OBERHEIDT, 1931), quand le protonéma est intact.

Par son orientation, par des relations susceptibles d'exister avec les variations de l'allongement des cellules où elle se produit, la mitose oblique occupe une place à part et est déterminante pour la morphogénèse du stade filamenteux.

Elle est à rapprocher de celle observée chez les Ptéridophytes, qui est responsable du passage de la croissance unidimensionnelle à la croissance bidimensionnelle. De la même manière, MILLER (1968) caractérise la croissance filamenteuse du prothalle par des divisions cellulaires perpendiculaires, et la croissance bidimensionnelle ou prothallienne par des mitoses obliques.

Le problème morphogénétique qui se pose est alors de déterminer les facteurs responsables du changement d'orientation des divisions cellulaires entre la première et la deuxième dimension, donc dans le protonéma, entre les mitoses perpendiculaires responsables de la croissance en longueur des axes, et les mitoses obliques responsables de la ramification.

En conséquence, le nombre de ramifications, donc le nombre de mitoses obliques, s'exprimera par le rapport R/N entre le nombre total R de rameaux latéraux observés et le nombre total N de cellules dénombrées sur un filament d'âge connu. Ce rapport, exprimant la densité de ramifications à l'échelle de la cellule, est indépendant de l'étiollement. En effet, pour une même valeur du rapport R/N , donc une même densité de ramifications, il est possible d'avoir une longueur de filament variant du simple au double puisque, suivant que la culture est faite à la lumière ou à l'obscurité, l'élongation cellulaire varie aussi du simple au double.

Suivant le milieu et les conditions de culture, la ramification peut être stimulée, inhibée ou constante. A chacun de ces cas correspondent des variations de même sens ou de sens contraire des termes R et N du rapport R/N . La réalité de ces données théoriques sera illustrée dans des expériences ultérieures qui nous permettront de préciser le mode d'action d'un certain nombre d'inhibiteurs de croissance et de morphogénèse.

II. — VARIATIONS DES DIVERS PARAMÈTRES EN FONCTION DU TEMPS

Les divers paramètres de la morphogenèse étant définis, il faut préciser s'ils restent constants pendant toute la durée de nos expériences. Ces mesures ont été réalisées sur *Ceratodon purpureus*, à l'obscurité et à la lumière (800 lux).

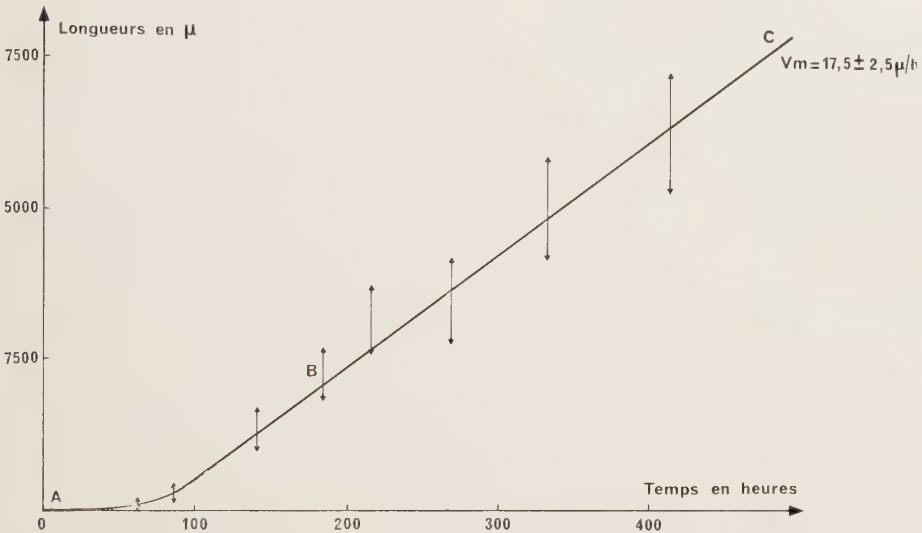


FIG. 24. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture sous un éclairage de 800 lux.
Croissance du protonéma en fonction du temps.

A. — Cultures à la lumière.

a) **Etude de la vitesse de croissance.** — La figure 24 montre que la croissance peut se diviser en deux phases :

— une phase exponentielle pendant les 180 premières heures de culture, soit les 8 premiers jours;

- - une phase linéaire durant laquelle la vitesse reste constante et égale à $17,5 \pm 2,5 \mu/h$; elle le restera pendant toute la durée de nos expériences (400 heures).

b) **Etude de la longueur moyenne des cellules.** — La longueur moyenne des cellules, d'abord égale à $55 \pm 7 \mu$, atteint $103 \pm 15 \mu$ après les 140 premières heures de culture, puis paraît se stabiliser, à partir de

200 heures, entre 70 et 90 μ , comme le montre la figure 25 (courbe 1). Il reste à démontrer que les valeurs moyennes obtenues pour le dixième, le douzième et le quinzième jour ne sont pas significativement différentes.

Dans ce but, pour chaque observation (2^e jour, 3^e jour, 5^e jour...) nous avons étudié le mode de distribution des différentes valeurs prises par la longueur des cellules. Les courbes obtenues ne présentent pas une distribution gaussienne.

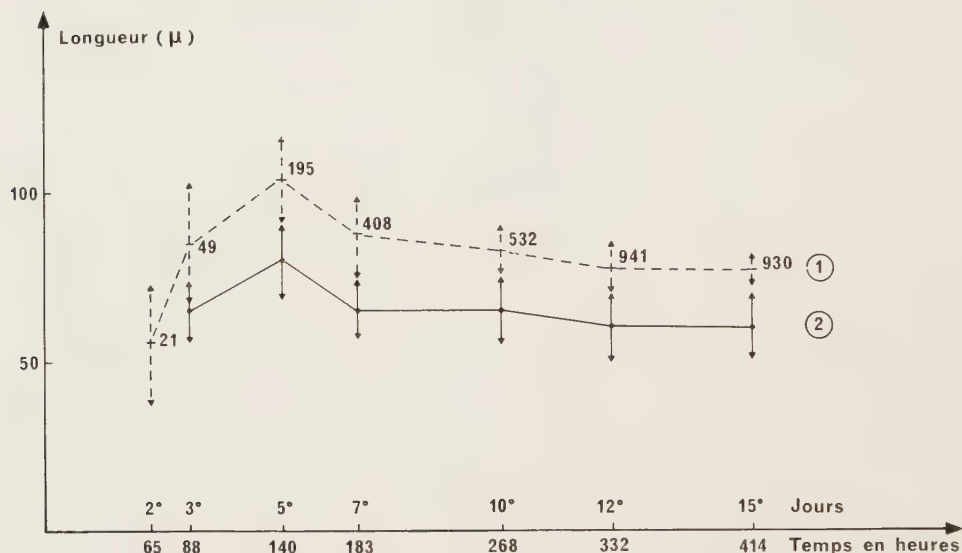


FIG. 25. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Courbe 1 : variations expérimentales (+) de la longueur moyenne des cellules en fonction du temps. (Les chiffres indiquent le nombre de cellules mesurées.)

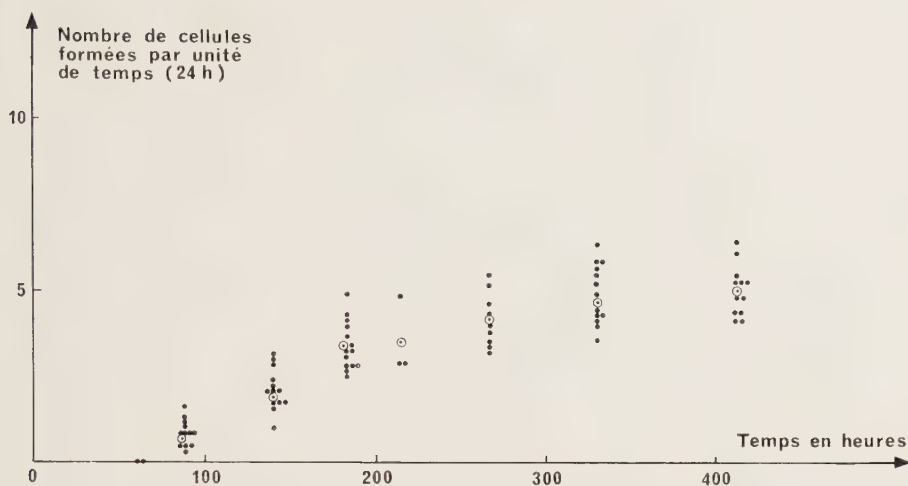
Courbe 2 : variations statistiques (x) de la valeur théorique la plus probable (xVPP) de la longueur des cellules en fonction du temps.

Les valeurs théoriques les plus probables obtenues sont constantes à partir du septième jour, les erreurs statistiques absolues n'étant pas significativement différentes comme le montre la courbe 2, figure 25. Les cellules mesurent entre 60 et 65 μ .

c) *Etude du rythme des mitoses.* — Il ne nous a pas été possible dans ce cas, vu le petit nombre de valeurs, de procéder à une étude statistique comme nous l'avons fait pour la longueur des cellules.

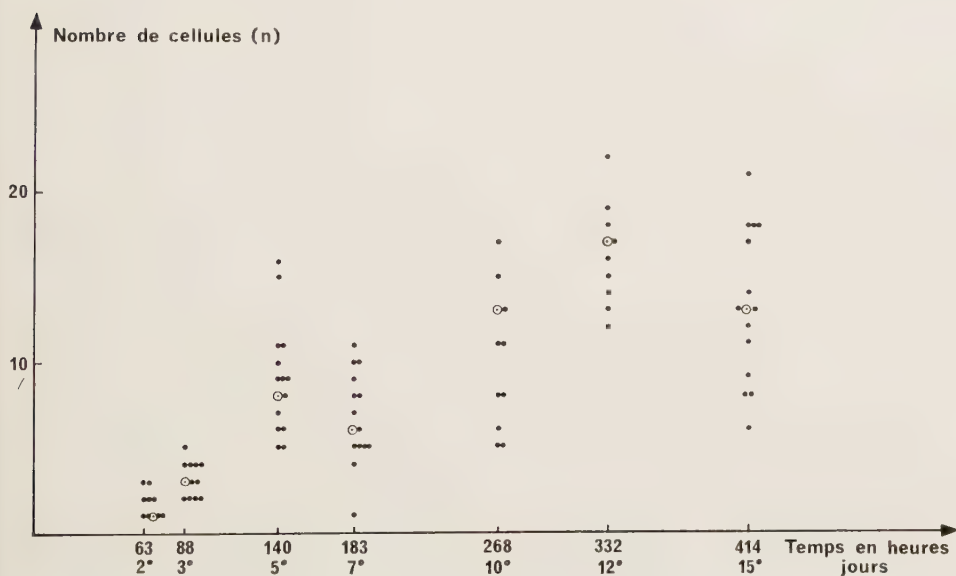
Le rythme des mitoses devient constant après 240 heures de culture, soit vers le dixième jour, et s'élève à $4,6 \pm 0,4$; il augmente progressivement pendant toute la phase exponentielle de la croissance (fig. 26).

d) *Distance entre le sommet et la première ramification.* — Cette variable, exprimée en nombre (n) de cellules présentes entre le sommet et la


 FIG. 26. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Variations du rythme des mitoses en fonction du temps. (○) valeur moyenne.


 FIG. 27. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à la lumière (800 lux).

Variations du nombre (n) de cellules entre le sommet et la première ramification.

première ramification, permet également de mesurer la dominance apicale : la première ébauche latérale apparaît d'autant plus loin du sommet que la préséance de l'apex est plus forte.

La figure 27 montre que ce nombre (n) oscille faiblement autour d'une valeur moyenne de 15 pendant toute la durée de l'expérience.

e) **Etude du pouvoir de ramification ($R/N \times 100$).** — Ce paramètre, calculé pour chacun des axes protonématiques, est obtenu en établissant le rapport entre le nombre total R de rameaux latéraux observés et le nombre total N de cellules dénombrées sur un filament d'âge connu.

Pendant la première partie de la phase exponentielle de croissance (100 heures), le rapport R/N reste faible, égal à 4 au maximum. Dans la deuxième partie (de 100 à 200 heures), ce rapport augmente progressivement pour atteindre une valeur statistiquement constante à partir de 240 heures et pendant la durée ultérieure des essais (fig. 28).

La ramification se stabilise donc pratiquement en même temps que les paramètres dirigeant la croissance des axes qu'ils portent.

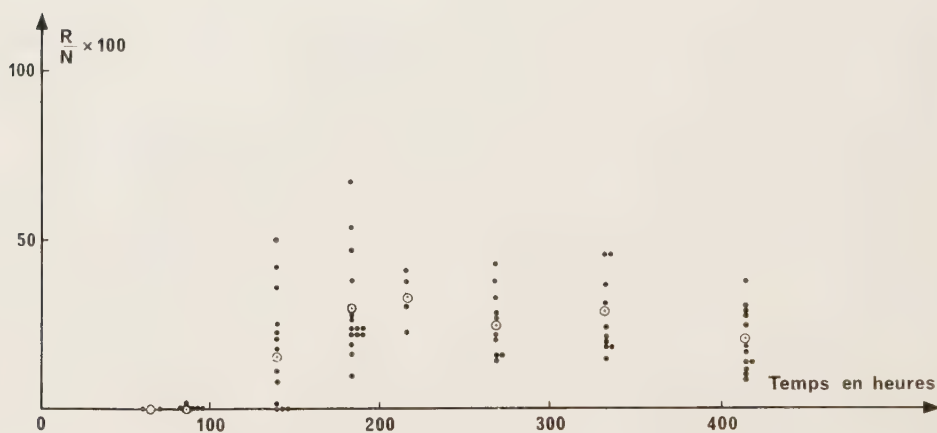


FIG. 28. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Variations du rapport $R/N \times 100$ en fonction du temps. (○) valeur moyenne.

Conclusions. — 1° Au cours du développement du protonéma, cultivé à la lumière, on met en évidence une phase exponentielle et une phase linéaire de croissance.

2° La phase exponentielle se caractérise par des valeurs des paramètres faibles mais en constante augmentation. Ces paramètres sont le rythme des mitoses, la longueur moyenne des cellules, le rapport R/N .

3° Pendant la phase dite de croissance constante, c'est-à-dire à partir de la deux centième heure, on assiste à une stabilisation progressive de tous les paramètres de la croissance et de la ramification, et en particulier du rythme des mitoses et du rapport R/N . A partir de 240 heures tous les facteurs étudiés deviennent constants.

4° Nos observations seront donc faites 10 jours après l'ensemencement pour les cultures réalisées à la lumière.

B. — *Cultures à l'obscurité.*

a) *Etude de la vitesse de croissance.* — On retrouve les deux phases de croissance définies précédemment :

— une phase exponentielle de 0 à 160 heures;

— une phase linéaire après 160 heures. C'est seulement en fin de phase linéaire que se situeront nos mesures. La vitesse de croissance est alors constante et égale à $32 \pm 5 \mu/h$.

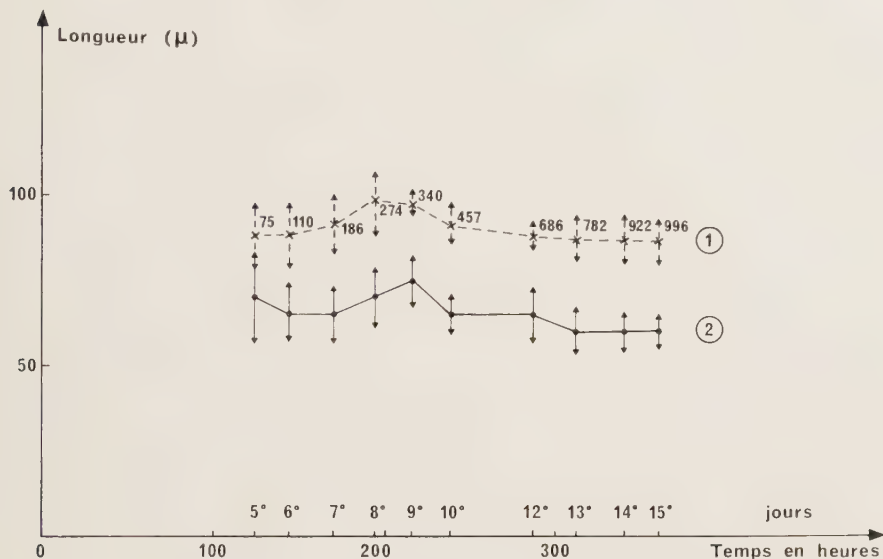


FIG. 29. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité sur milieu minéral (A) glucosé (5 g/l).

Courbe 1 : variations expérimentales (+) de la longueur moyenne des cellules en fonction du temps. (Les chiffres indiquent le nombre de cellules mesurées.)

Courbe 2 : variations statistiques (.) de la valeur théorique la plus probable (xVPP) de la longueur des cellules en fonction du temps.

b) *Etude de la longueur moyenne des cellules.* — Cette étude a été conduite d'une manière identique à celle décrite précédemment dans le cas des cultures à la lumière.

Les valeurs statistiques les plus probables résumées dans la figure 29, courbe 2, montrent que c'est bien entre 240 et 260 heures, soit au onzième jour, que la longueur des cellules atteint une valeur constante comprise entre 60 et 65 µ.

c) *Etude du rythme des mitoses.* — Le rythme des mitoses augmente de 0 à 260 heures environ, puis devient constant et égal en moyenne à 9 entre le dixième et le douzième jour de culture.

d) Distance entre le sommet et la première ramification. — Exprimée par le nombre (n) de cellules dépourvues de ramification, cette distance oscille entre 4 et 9.

e) Etude du pouvoir de ramification ($R/N \times 100$). — Le rapport R/N augmente de 0 à 220 heures de culture, puis se stabilise aux environs de 50 entre le dixième et le douzième jour de culture.

**C. — Comparaison de l'évolution des paramètres
à la lumière et à l'obscurité.**

a) A la lumière comme à l'obscurité, on retrouve les deux phases caractéristiques de toute croissance : une phase exponentielle plus longue à la lumière (180 heures) qu'à l'obscurité (160 heures) et une phase linéaire lui faisant suite.

b) L'élongation cellulaire est constante à partir du septième jour à la lumière, et seulement à partir du onzième jour à l'obscurité.

c) Le rythme des mitoses augmente constamment pour atteindre une valeur constante au bout de 10 jours à la lumière et de 11 jours à l'obscurité. A l'obscurité, il est égal à 9, soit le double de sa valeur à la lumière (4,6).

d) Enfin, le rapport R/N se stabilise à partir de 10 jours de culture à la lumière et de 11 jours à l'obscurité.

De ces observations, on peut conclure que des résultats seront comparables si les mesures sont faites :

- 1° à partir du dixième jour de culture à la lumière;
 - 2° à partir du douzième jour à l'obscurité.
-

CHAPITRE IV

ACTION DE LA LUMIÈRE SUR LA CROISSANCE ET LA RAMIFICATION DU PROTONÉMA

La lumière est un facteur morphogène important : son absence engendre une dominance apicale (chap. II). Pour mieux comprendre son mode d'action, il était intéressant d'étudier la morphogenèse du protonéma en fonction de variations quantitatives et qualitatives de l'éclairement, à l'aide des paramètres définis dans le précédent chapitre.

Pour de nombreux auteurs (MITRA et ALLSOPP, 1959; MACHLIS, 1962), la lumière n'est pas seulement un facteur trophique. Le glucose ne parvient pas à la remplacer totalement, ce qui laisse supposer un rôle plus complexe. Nous comparerons donc les résultats obtenus :

- à l'obscurité en présence de glucose;
- à la lumière à différentes intensités, pour essayer de préciser les analogies et les différences dans l'action de ces deux facteurs.

I. — VARIATIONS DE LA CROISSANCE ET DE LA RAMIFICATION EN FONCTION DE L'ÉCLAIREMENT

Nos expériences ont été réalisées principalement sur *Ceratodon purpureus*. Des résultats comparables obtenus sur *Leptobryum pyriforme* ont permis de vérifier que les conclusions peuvent être généralisées.

1° La lumière permet un développement généralisé et identique de tous les centres en croissance.

2° L'optimum de lumière pour la ramification, d'une part, et pour l'allongement (rythme des mitoses), d'autre part, est différent :

- ainsi, un éclairement de 800 lux, pour le *Ceratodon*, permet une

croissance en longueur optimale alors que la ramification est encore inhibée (fig. 30).

- entre 800 et 1 000 lux, la fréquence des mitoses perpendiculaires diminue au profit, semble-t-il, des mitoses obliques dont le nombre s'élève.

La croissance en longueur d'une cellule empêche sa ramification. Il y aurait là un phénomène de compétition entre l'élongation et une forme d'élargissement cellulaire qui se manifesterait sur des organismes filamenteux, comme le protonéma, par la naissance d'une ébauche latérale. Ces résultats sont à rapprocher de ceux de MILLER

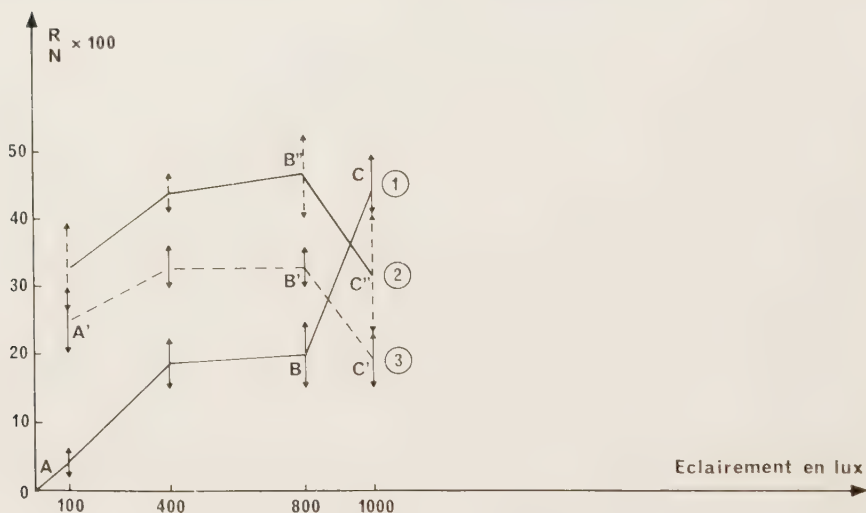


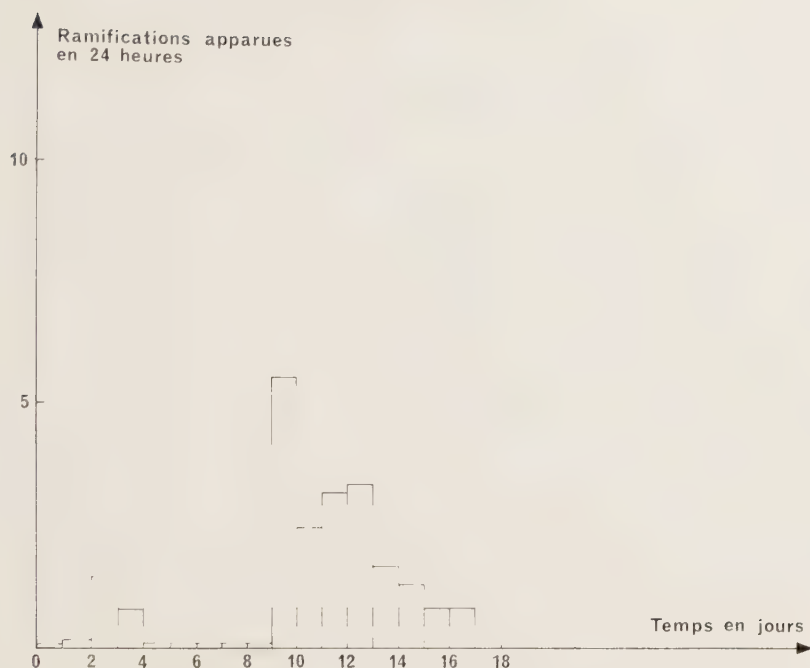
FIG. 30. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Action comparée de l'éclairement sur le rythme des mitoses (3), la vitesse de croissance (2) et la ramification (rapport R/N) (1) du protonéma.

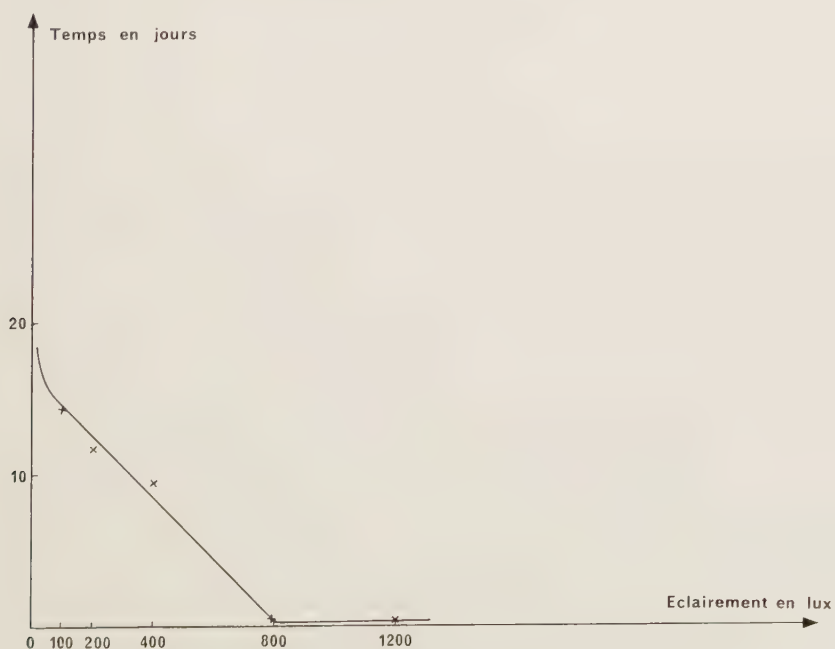
et MILLER (1961, 1965), MILLER (1968), DAVIS (1968), et, plus particulièrement, SOBOTA et PARTANEN (1965), sur le prothalle de fougères dont la croissance reste filamenteuse aux faibles intensités lumineuses et à l'obscurité. Ces auteurs confirment que la division cellulaire se fait de préférence dans deux plans quand on est en présence de cellules isodiamétriques et dans un seul plan si les cellules sont allongées.

3° Lorsque l'énergie lumineuse diminue, les ramifications apparaissent après un temps de latence de plus en plus long, lorsque la vitesse de croissance est constante et optimale (fig. 31 et 32).

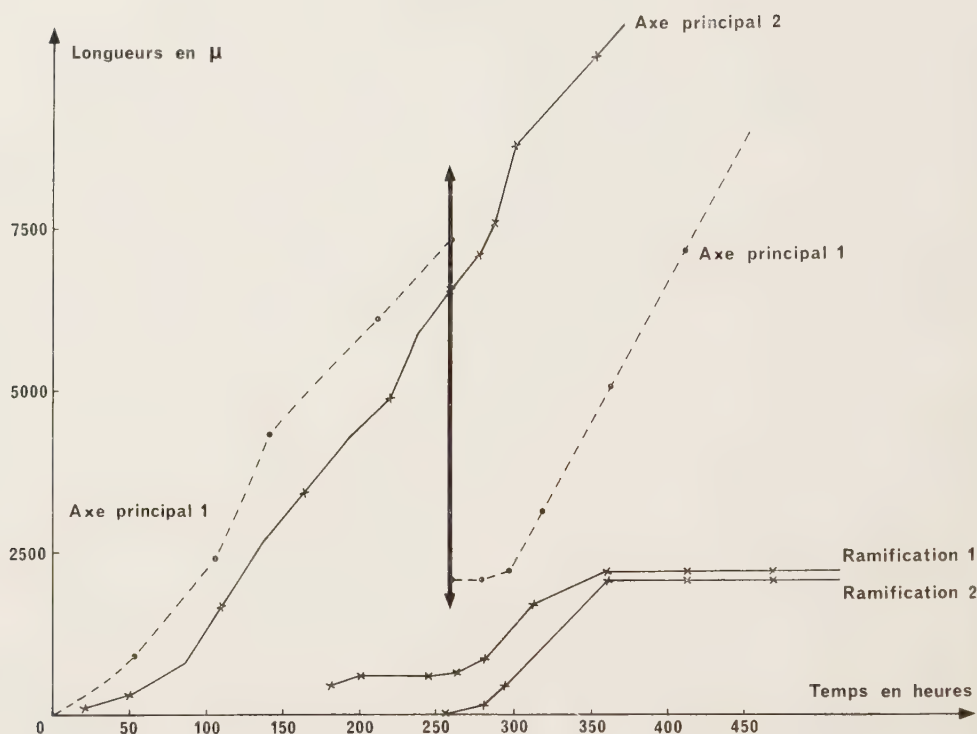
4° La diminution de l'éclairement, à partir de 800 lux, est responsable de la mise en place d'une dominance apicale partielle qui se manifeste par la suppression progressive des ramifications et l'augmentation du pourcentage de rameaux inhibés.


 FIG. 31. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture sous un éclaircment de 400 lux. Rythme d'apparition des ramifications sur un protonéma. Mise en évidence d'un temps de latence de 6 jours séparant les deux vagues d'apparition des ramifications.


 FIG. 32. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Variation du temps de latence en fonction de l'éclairciment.

FIG. 33. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 400 lux. Action de la décapitation d'un axe principal sur la croissance des ramifications inhibées.

Ces corrélations répondent, pour une part, aux critères de la dominance apicale définie chez les végétaux supérieurs et chez les champignons (fig. 33). Cependant, chez le protonéma de Bryales, les ébauches qui se développent après décapitation subissent à nouveau la préséance du régénérat axial.

II. — CROISSANCE ET RAMIFICATION DU PROTONÉMA CULTIVÉ EN LUMIÈRES MONOCHROMATIQUES

Sous un faible éclairciment (400 lux), les ramifications apparaissent brusquement après un temps de latence. On pouvait supposer que ce phénomène répondait à une induction en relation avec l'accumulation de substances morphogènes, comme MITRA et ALLSOPP (1959) en formulent l'hypothèse.

D'autre part, MOHR (1965) et VALANNE (1966) ont mis en évidence

l'action d'un système phytochrome au tout premier stade de la germination (gonflement, éclatement de l'exospore).

De même, la régénération des feuilles isolées de *Mnium affine* est contrôlée par un système phytochrome (GILES et MALTZAHN, 1967).

Enfin JAHN (1964) souligne l'importance des radiations rouges et bleues sur le bourgeonnement des Bryales.

La morphologie du protonéma en elle-même n'a été que fort peu étudiée (PRINGSHEIM et PRINGSHEIM, 1935; MITRA et coll., 1959; MITRA, MISRA et PRABHA, 1965). Leurs observations sont faites à une échelle macroscopique (mesure de diamètres de colonies) et pour une gamme de longueurs d'onde souvent restreinte. Une étude plus détaillée, au niveau cellulaire et en fonction d'un plus grand nombre de longueurs d'onde, pouvait apporter des précisions intéressantes.

Les expériences réalisées sur la Funaire ont été effectuées à l'aide de l'illuminateur spectral du phytotron. La lumière est donnée 24 heures sur 24 heures.

A. — *Spectre d'action de la croissance du protonéma.*

L'étude de la croissance se fait en fonction des trois variables habituelles : longueur moyenne des cellules, nombre de cellules formées par unité de temps (24 heures) (rythme des mitoses) et vitesse d'allongement des axes principaux, résultante des deux facteurs précédents.

Les résultats montrent que :

1° l'aspect morphologique des filaments protonématiques dépend de la lumière :

— pour des longueurs d'onde comprises entre 510 m μ et 576 m μ d'une part, et supérieures à 676 m μ d'autre part, le protonéma se présente sous la forme de très longs filaments totalement incolores, rappelant ceux obtenus en l'absence de lumière;

— en rouge court (676 m μ), le protonéma s'allonge en décrivant des courbes analogues aux spires de torsion homodrome des plantes supérieures; LAZARENCKO et coll. (1961), MITRA, ALLSOPP et WAREING (1959) parlent à leur sujet de nutation. Les filaments sont verts et présentent des chloroplastes allongés;

— dans le bleu (476 m μ), les cultures ont un aspect vert foncé, les chloroplastes sont ronds et très serrés.

2° La longueur moyenne des cellules et le rythme des mitoses présentent des maximums dans des régions différentes du spectre. Alors que l'élongation cellulaire atteint son optimum dans le vert (543 m μ) et le rouge long (710 m μ), le rythme des mitoses est maximal dans le bleu (476 m μ) et dans le rouge court.

3° Les variations de la longueur moyenne des cellules étant bien supérieures à celles mesurées par le nombre de divisions en 24 heures,

la courbe de la vitesse de croissance se superpose à celle de l'allongement cellulaire (fig. 34) avec des maximums à 510 et 710 m μ , c'est-à-dire dans le vert et dans le rouge long où la croissance est aussi rapide qu'à l'obscurité.

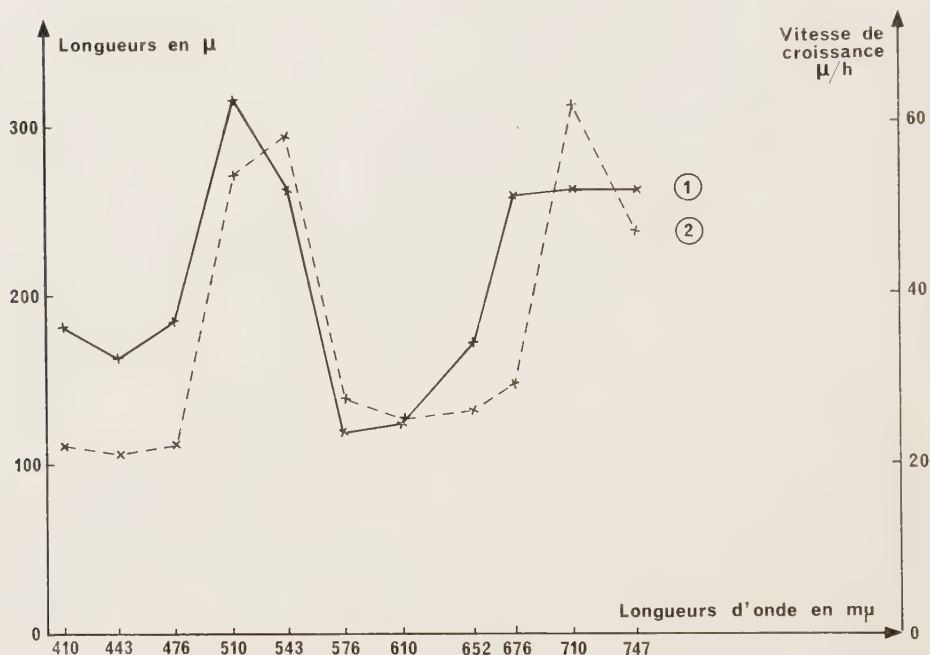


FIG. 34. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Variations de la vitesse de croissance (1) et de la longueur moyenne des cellules (2) en fonction de la longueur d'onde.

B. — Spectre d'action de la ramification du protonéma.

Sur la figure 35 sont portées les valeurs du rapport $R/N \times 100$, en fonction des différentes longueurs d'onde.

1° C'est dans le bleu (443 m μ) et dans le rouge court (652 m μ) que les axes protonématiques engendrent le plus grand nombre de rameaux latéraux. L'action fortement stimulatrice du rouge (R/N égal à 57 au lieu de 26 dans le bleu) est en partie apparente. En effet, le spectre réalisé est isoénergétique; sa transformation en spectre isoquantique (fig. 35) conduit à multiplier le rapport R/N obtenu dans le bleu par 1,6 (facteur de correction correspondant au rapport des longueurs d'onde à comparer: 747/443); ce qui donne 43 au lieu de 26 pour le rapport R/N dans le bleu. Cette correction est effectuée en supposant qu'il y a proportionnalité entre l'énergie et la réaction mesurée. L'activité du bleu serait donc égale à 0,7 fois celle du rouge. C'est une valeur

assez voisine de celle trouvée dans la photosynthèse (RABINOVITCH, 1951, 1956).

De plus, mitoses perpendiculaires et mitoses obliques passent par un maximum pour des valeurs des longueurs d'onde approximative-

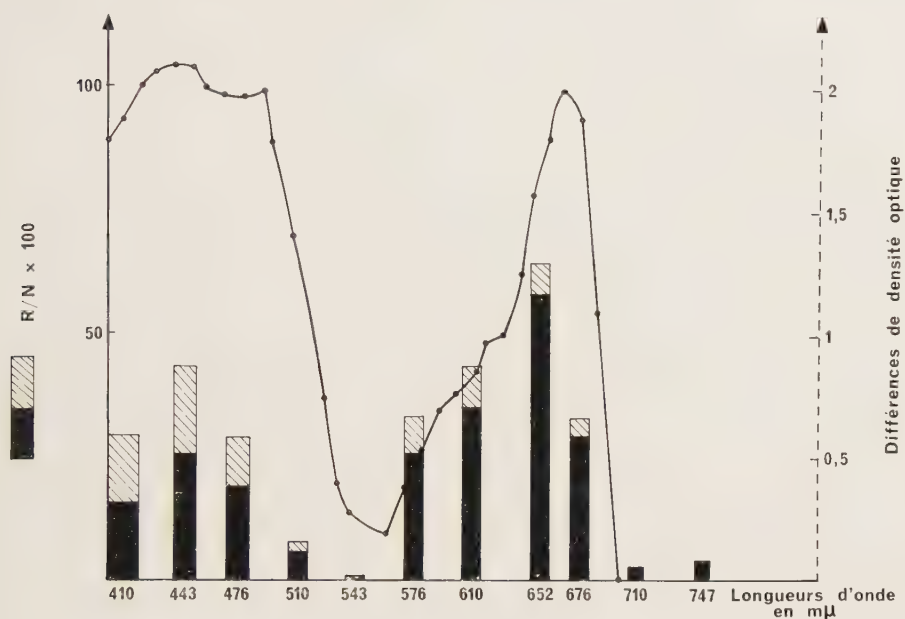


FIG. 35. — *Funaria hygrometrica* Hedw.

Spectre d'action isoénergétique (■) et isoquantique (////) de la ramification du protonéma.

ment identiques. Ce qui est différent des résultats observés en lumière blanche pour une même énergie.

2° Tous les rameaux latéraux nés en lumière bleue ou rouge sont aptes à la croissance: au contraire, à 510 mμ, 20 % environ restent à l'état d'ébauches; on retrouve la dominance partielle, existant pour des valeurs de l'éclairement inférieures à 800 lux.

3° Nos résultats confirment en partie ceux de PRINGSHEIM (1935), obtenus sur la Funaire cultivée en lumière rouge et verte. Il est difficile d'expliquer, autrement que par une qualité insuffisante des filtres, la disparition totale de la ramification observée par cet auteur en lumière bleue.

4° Le spectre d'action de la ramification et le spectre d'absorption *in vivo* sont qualitativement identiques (fig. 35), ce qui confirme le rôle important de la photosynthèse dans la morphogenèse du protonéma.

C. — *Discussion.*

Des résultats obtenus, on peut conclure que la ramification est entièrement contrôlée par le système photosynthétique, et non par le phytochrome. En effet :

1° Le contrôle de la morphologie par un système phytochrome impliquerait que la ramification soit liée à des phénomènes d'induction. Or :

— un traitement de 72 heures en rouge court n'a aucun effet sur l'aptitude des filaments à engendrer des ramifications lorsqu'ils sont placés de nouveau à l'obscurité;

— de même, l'exposition pendant 96 heures en lumière blanche d'un protonéma de *Funaria* développé pendant 6 jours à l'obscurité permet l'apparition de ramifications pendant la seule période d'éclairement. Si la lumière est supprimée, aucune ébauche ne se forme; quelques rameaux, nés à la lumière et situés au hasard, poursuivent leur croissance.

2° En lumière verte, le rapport R/N devrait être faible mais non égal à 0 comme il l'est dans nos expériences. On sait en effet qu'aux fortes énergies, et dans les conditions de nos expériences (450 μ W/cm²/sec.), une partie du phytochrome est obligatoirement sous sa forme active (JACQUES, 1967).

3° Enfin, si nous comparons ces résultats avec ceux obtenus en lumière blanche, on s'aperçoit :

— qu'il existe une lumière monochromatique, le rouge court (676 m μ), optimale à la fois pour l'allongement (mitoses perpendiculaires) et la ramification (mitoses obliques), ce que nous n'avons jamais obtenu, à aucun des éclaircissements considérés;

— que la lumière bleue est celle qui se rapproche le plus de l'action de la lumière blanche, puisque la ramification y est maximum, alors que le rythme des mitoses n'atteint pas sa valeur optimale : toutefois, elle n'est pas meilleure pour la croissance que la lumière blanche, comme le mentionnent MITRA, MISRA et PRABHA sur le *Pohlia nutans* (1965). Il semble aussi que la lumière bleue masque l'action optimale du rouge, en lumière blanche;

— que c'est en lumière rouge (676 m μ) que le rythme des mitoses est le plus élevé (6,2 par 24 heures) et que la taille des cellules est la plus petite, ce qui correspond à ce que nous avons observé en lumière blanche aux forts éclaircissements : c'est une preuve supplémentaire de la corrélation étroite qui lie ces deux phénomènes.

Conclusion. — De nombreux travaux antérieurs (SERVETTAZ, 1913; UBISCH, 1913; ROBBINS, 1918; PRINGSHEIM et PRINGSHEIM, 1935; HEITZ, 1939; MILLER et MILLER, 1961, 1965; BOPP, 1965), mentionnaient le rôle de la lumière dans la morphogénèse du protonéma : les expé-

riences exposées ci-dessus apportent une confirmation et des faits nouveaux.

La lumière : contrôle la ramification par l'intermédiaire d'un système photosynthétique; l'intervention du système phytochrome n'a pu être décelée;

— établit et modifie les corrélations entre les mitoses perpendiculaires responsables de l'allongement des axes et les mitoses obliques génératrices de ramifications.

III. — ACTION COMPARÉE DU SUCRE ET DE LA LUMIÈRE SUR LA CROISSANCE ET LA RAMIFICATION DU PROTONÉMA DE *CERATODON PURPUREUS* (Brid.)

Nous savons que, cultivé à l'obscurité, sur milieu minéral, le protonéma de *Ceratodon purpureus* forme de très longs filaments nus. En présence de glucose, de très nombreuses ramifications apparaissent sur les axes principaux (chap. II; fig. 17).

TABLEAU 36. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Action comparée du glucose et de la lumière à différentes intensités sur les divisions cellulaires.

CONDITIONS DE CULTURE		LONGUEUR MOYENNE DES CELLULES (μ)	NOMBRE DE CELLULES FORMÉES PAR 24 HEURES	VITESSE DE CROISSANCE R/N $\times$ 100 (μ /h)	
Eclairéments lux	Concentration en glucose (g/l)				
0	0	108 $\pm$ 5	9,2 $\pm$ 0,7	44 $\pm$ 5	0
	1 $\cdot$ 10 ⁻³	119 $\pm$ 1	9,9 $\pm$ 1,3	37 $\pm$ 11	0,006
	6 $\cdot$ 10 ⁻³	98 $\pm$ 15	8,1 $\pm$ 0,4	33 $\pm$ 4	26
	1 $\cdot$ 10 ⁻¹	93 $\pm$ 13	7,7 $\pm$ 1,7	31 $\pm$ 4	34
	5	79 $\pm$ 12	9,4 $\pm$ 1,0	31 $\pm$ 5	41
100	0	101 $\pm$ 28	6,6 $\pm$ 1,3	25 $\pm$ 6	4
400	0	85 $\pm$ 25	8,8 $\pm$ 0,6	33 $\pm$ 3	19
800	0	73 $\pm$ 20	9,3 $\pm$ 1,2	33 $\pm$ 5	20
1 000	0	73 $\pm$ 18	6,3 $\pm$ 1,7	19 $\pm$ 4	43

La lumière et le glucose à l'obscurité ont donc le même effet morphogénétique global apparent (tableau 36) :

— ils inhibent la vitesse de croissance : 44 μ /h à l'obscurité contre 31 μ /h en présence de glucose et 33 μ /h à la lumière à 800 lux;

— ils stimulent le pouvoir de ramification : le rapport R/N nul à

l'obscurité s'élève à 40 en présence de glucose, et à 20 à la lumière à 800 lux (valeur de l'éclairement où le rythme des mitoses perpendiculaires demeure constant comme en présence de sucre).

Toutefois, malgré ces analogies, des différences doivent être soulignées et discutées.

1° Si le glucose est sans effet sur le rythme des mitoses au niveau des axes principaux (tableau 36), la lumière au contraire, lorsqu'elle est assez intense, réduit le nombre des mitoses perpendiculaires qui, de 9,3 à 800 lux, passe à 6,3 à 1 000 lux.

Donc, le glucose inhibe la vitesse d'allongement des axes protonématiques en diminuant uniquement l'élongation cellulaire. Au contraire, la lumière à forte intensité agit à la fois sur les divisions perpendiculaires et la longueur des cellules.

2° Pour évaluer le potentiel total de croissance des cellules, il est nécessaire d'ajouter aux mitoses perpendiculaires, responsables de la croissance en longueur des filaments, les mitoses obliques qui contrôlent la ramification :

— en l'absence de lumière, le sucre stimule ces mitoses obliques, alors que le nombre de mitoses perpendiculaires demeure inchangé (tableau 36) : en effet R/N étant égal à 0,41, le nombre N de cellules

TABLEAU 37. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).
Actions comparées du glucose et de la lumière
à différentes intensités, sur les divisions cellulaires.

ECLAIREMENTS EN LUX	MILIEU DE CULTURE	NOMBRE DE RAMIFICATIONS APPARUES EN 24 HEURES	RYTHME DES MITOSES	NOMBRE TOTAL DE DIVISIONS CELLULAIRES EN 24 HEURES
0	A + 0 g/l glucose.	0	9,2	9,2
0	A + 5 g/l glucose.	3,8	9,4	13,2
100	A + 0 g/l glucose.	0,2	6,6	6,8
400	A + 0 g/l glucose.	1,6	8,8	10,4
800	A + 0 g/l glucose.	1,8	9,3	11,1
1 000	A + 0 g/l glucose.	2,7	6,3	9,0

formées par 24 heures s'élevant à 9,4 le nombre de ramifications apparues pendant le même temps est donné par le produit de ces deux facteurs soit 3,8. La somme des divisions cellulaires est alors augmentée et passe de 9,4 à 13,2 contre 9,2 sur milieu purement minéral;

— des calculs analogues, faits pour des cultures réalisées à la lumière, sous des éclairagements variés, donnent les résultats résumés dans le tableau 37. On constate alors :

a) qu'à 800 lux, le nombre total des mitoses est maximum (11,1 par 24 heures, soit 9,3 pour les mitoses perpendiculaires et 1,8 pour les mitoses obliques) tout en demeurant inférieur à celui obtenu sur milieu minéral glucosé à l'obscurité (13,2 par 24 heures, soit 9,4 pour les mitoses perpendiculaires et 3,8 pour les mitoses obliques);

b) qu'une augmentation, soit de l'énergie lumineuse, soit de la concentration en glucose, favorise la ramification; mais en présence de sucre à l'obscurité les mitoses perpendiculaires demeurent constantes alors qu'elles sont réduites dans le cas de variations de l'éclairement.

3° L'action du sucre, comparée à celle de la lumière, est plus favorable à la multiplication cellulaire, mais demeure insuffisante en ce qui concerne le développement des ramifications : le glucose, en effet, stimule l'apparition des rameaux latéraux, mais 49 % d'entre eux restent à l'état d'ébauches; il subsiste donc une dominance apicale partielle mesurable par ce pourcentage. Au contraire, à la lumière (800 lux et au-dessus) tous les apex restent en croissance, toute forme de préséance a disparu.

Conclusion. — Le sucre et la lumière ont une action apparemment identique sur la croissance du protonéma de *Ceratodon purpureus* : inhibition de la vitesse d'allongement et stimulation de la ramification. Toutefois, cette convergence morphologique est le résultat de la variation de facteurs de croissance différents dans les deux cas :

— la lumière (1 000 lux) inhibe fortement les divisions perpendiculaires de l'axe principal tout en stimulant les mitoses obliques : on assiste à une sorte d'effet compensateur, conforme aux observations de SOBOTA et PARTANEN (1966) sur le gamétophyte de fougères; ces auteurs avancent l'hypothèse d'une relation directe entre le taux de divisions cellulaires et le plan de ces divisions;

— le glucose ne modifie pas les divisions perpendiculaires mais stimule le pouvoir de ramification.

A l'efficacité du sucre pour les divisions, s'oppose l'action spécifique de la lumière pour le développement simultané de tous les rameaux latéraux.

Les expériences réalisées jusqu'alors permettent de conclure que l'existence de corrélations entre les axes est la conséquence de conditions de culture défavorables. Le glucose, en provoquant la naissance des ébauches latérales, comble partiellement les carences créées par un développement à l'obscurité totale. Cependant, seule la photosynthèse permet à tous les rameaux latéraux de se développer à la même vitesse que l'axe.

Deux possibilités s'offraient à nous pour poursuivre les recherches dans ce domaine :

— enrichir le milieu de culture à l'obscurité, de façon à éliminer entièrement les préséances, donc à reproduire exactement l'effet de la lumière;

— ajouter au milieu minéral permettant le meilleur développement à la lumière, des inhibiteurs connus de certaines chaînes de biosynthèse, de façon à créer ces préséances.

La première méthode s'est révélée infructueuse : extrait de levure, hydrolysats de caséine, acides aminés employés seuls ou en mélange à des concentrations variées n'ont eu aucun effet. Aucun milieu de culture, si riche soit-il, ne remplace l'énergie lumineuse.

De plus, l'influence du glucose à l'obscurité, décrite chez le *Ceratodon*, a été étudiée sur la *Funaire* et le *Leptobryum* : elle s'est révélée nulle. L'addition de molécules organiques plus ou moins complexes (hydrolysats de caséine, extrait de levure, lait de coco, asparagine, kinétine, ATP, APG, bactocasitone, acide β -indolylacétique, acide gibbérellique seul ou en mélange) est aussi sans effet. Il faut donc envisager l'existence d'un facteur de ramification plus spécifique, que la *Funaire* et le *Leptobryum* sont incapables de synthétiser à l'obscurité. Nous exposerons dans le chapitre suivant une partie des essais réalisés pour déterminer sa nature.

La deuxième méthode nous a, au contraire, permis d'obtenir des résultats intéressants qui seront également analysés et discutés dans le chapitre suivant, en fonction des différents critères de la dominance apicale : nombre de ramifications par cellule (rapport R/N), pourcentage de ramifications inhibées.

CHAPITRE V

MÉCANISMES RESPONSABLES DES CORRÉLATIONS D'INHIBITION DANS LE PROTONÉMA DES BRYALES

Le protonéma de nombreuses espèces de Bryales (*Funaire*, *Ceratodon*, *Leptobryum*, *Bryum*, *Buxbaumia*...) ne se ramifie pas à l'obscurité. Il s'agit bien d'une dominance apicale totale, car si l'on détruit le sommet de l'axe principal des ébauches peuvent apparaître et se développer. Au point de décapitation naît souvent un axe de remplacement qui impose alors sa préséance aux jeunes ramifications latérales. Un métabolite banal, comme le glucose, supprime en partie les corrélations d'inhibition chez le *Ceratodon*. Des milieux de culture plus complexes n'améliorent pas les résultats. Nous avons alors essayé à l'aide de molécules plus particulières (acide traumatique, colchicine...), d'une part, de faire apparaître des ébauches latérales sur les protonémas de type *Funaire* et *Leptobryum*, et, d'autre part, de diminuer le pourcentage des rameaux inhibés chez les espèces comme le *Ceratodon*.

Puis nous avons recherché si des inhibiteurs variés étaient ou non capables d'induire des préséances entre axes, permettant ainsi une analyse plus approfondie du mécanisme des corrélations.

I. — ÉTUDE D'UN FACTEUR DE RAMIFICATION : L'ACIDE TRAUMATIQUE

A. — *Essais relatifs à des substances stimulatrices de la croissance.*

Des molécules considérées comme capables de stimuler la croissance en agissant tant sur le protoplasme (kinétine, auxine : BOPP, 1953; BELKENGREN, 1962 ; gibbérelline : BELKENGREN, 1962 ; MITRA et ALLSOPP, 1959; VAARAMA et NINA TAREN, 1959) que sur la membrane (griséofulvine) ont été utilisées. Les résultats furent tous négatifs.

Seule l'addition d'acide traumatique a conduit à des résultats réguliers et originaux. On sait que, chez les végétaux supérieurs, cette hormone stimule certaines divisions cellulaires (ROSENSTOCK, 1963).

B. — Action de l'acide traumatique.

1° Comme la lumière (et le glucose pour *Ceratodon*), l'acide traumatique inhibe la vitesse d'allongement des filaments protonématiques.

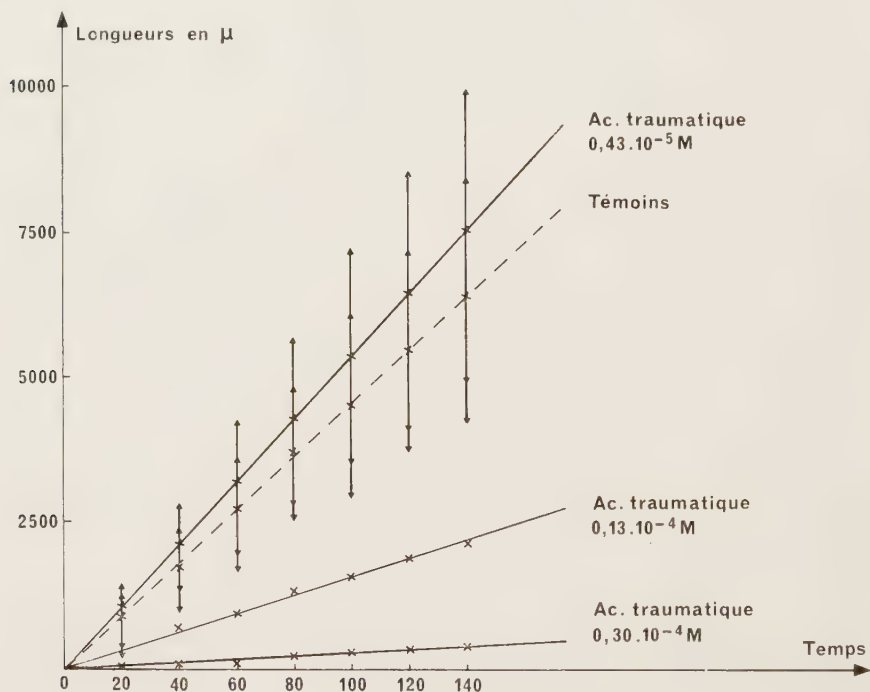


FIG. 38. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à l'obscurité.

Action de l'acide traumatique sur la vitesse de croissance du protonéma.

Cette diminution est due à un rythme plus faible des mitoses perpendiculaires, et un allongement plus faible des cellules (fig. 38).

2° La traumatine comme la lumière (et le glucose pour le *Ceratodon*) stimulent les mitoses obliques responsables de la ramification (fig. 39).

3° Comme le glucose pour le *Ceratodon*, elle provoque la naissance des ébauches latérales, mais ne permet pas leur croissance généralisée. Une dominance apicale partielle subsiste, se traduisant par un pourcentage (59 %) de rameaux inhibés.

4° Comme chez les champignons et les plantes supérieures, il est

donc nécessaire de distinguer entre deux phénomènes : naissance et croissance des ramifications.

5° Nous avons essayé de généraliser l'action de l'acide traumatique à d'autres espèces, comme le *Ceratodon* et le *Leptobryum*, en l'absence de glucose. Les résultats sont beaucoup moins spectaculaires, voire même négatifs. Aucune hypothèse n'est encore possible pour tenter d'expliquer cette action apparemment spécifique de cette substance sur le protonéma de *Funaire*, car il est difficile d'admettre que le *Ceratodon* à l'obscurité synthétise de l'acide traumatique. Tout

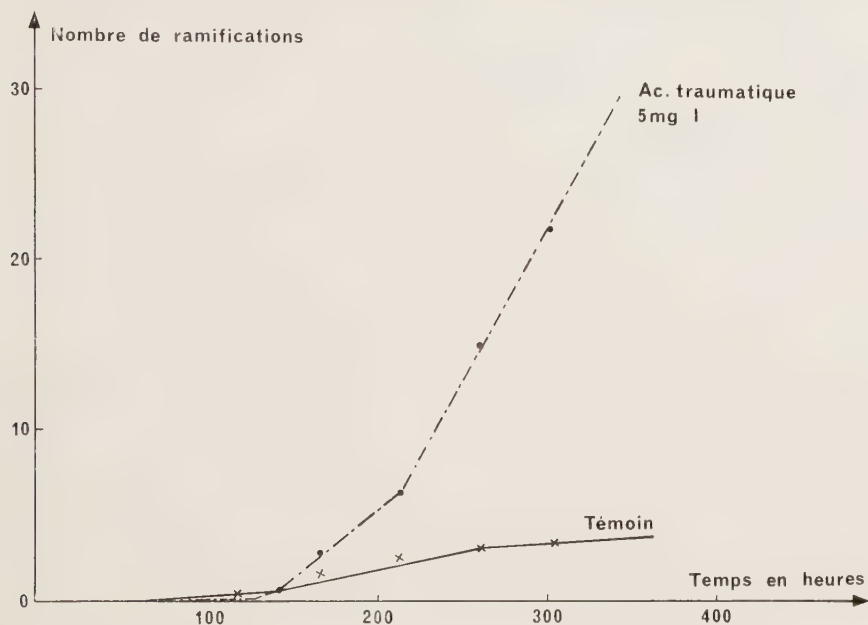


FIG. 39. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à l'obscurité.

Action de l'acide traumatique sur la ramification du protonéma.

au plus peut-on penser qu'il possède une molécule inconnue, particulière, qui aurait un effet analogue.

6° L'acide traumatique stimule la ramification en modifiant très sensiblement la vitesse de croissance des filaments protonématiques.

7° Les facteurs susceptibles de stimuler la ramification sont de nature variée. Ce sont :

- des facteurs trophiques, comme le glucose pour le *Ceratodon*;
- des facteurs de divisions cellulaires, comme l'acide traumatique.

8° La morphogénèse du protonéma de Bryales est fonction de deux variables :

- la vitesse d'allongement des axes;
- leur ramification.

Une corrélation entre les deux n'est pas obligatoire. Si, chez la *Funaire*, la stimulation des mitoses obliques semble aller de pair avec une diminution du rythme des mitoses perpendiculaires, chez le *Ceratodon* la stimulation de la ramification peut ne s'accompagner d'aucune modification de la vitesse de croissance (mitoses perpendiculaires).

II. — INHIBITION SPÉCIFIQUE DE LA RAMIFICATION : MISE EN ÉVIDENCE DU RÔLE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES

Trois substances ont permis d'obtenir les résultats escomptés : la 8-azaguanine, la D-actinomycine, la ribonucléase.

A. — Action de la 8-azaguanine.

L'azaguanine est connue pour être un inhibiteur de la synthèse des acides ribonucléiques chez les bactéries, MANDEL (1957). HOTTA et RAGHAVAN (1958) ont montré que, chez les Ptéridophytes, cette

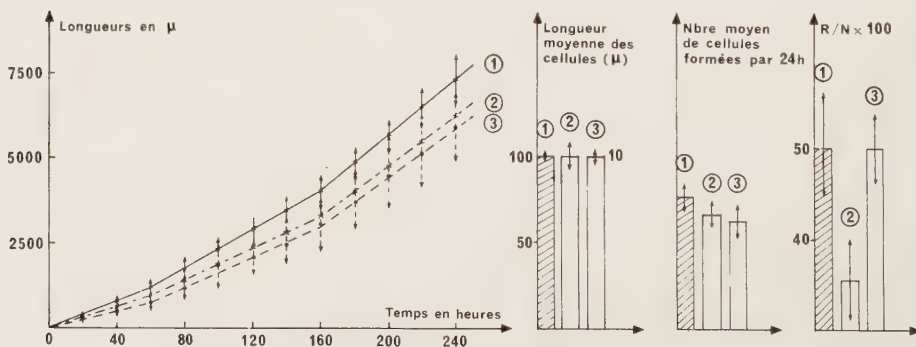


FIG. 40. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité.

Action de la 8-azaguanine (2) et du mélange 8-azaguanine-guanine (3) sur la croissance et la ramification du protonéma. Témoins : courbe n° 1.

substance supprimait la croissance bidimensionnelle du prothalle :

— la 8-azaguanine est un inhibiteur spécifique des mitoses obliques, alors qu'elle reste sans action sur les mitoses perpendiculaires (fig. 40), sauf aux très hautes concentrations, pour lesquelles des effets toxiques doivent apparaître.

- La guanine supprime l'action de la 8-azaguanine, qui agit donc en tant qu'inhibiteur spécifique (fig. 41 et 42).

Cette spécificité est vraisemblablement liée à la synthèse des ARN puisqu'on ne la retrouve pas en présence de 5-FUDR.

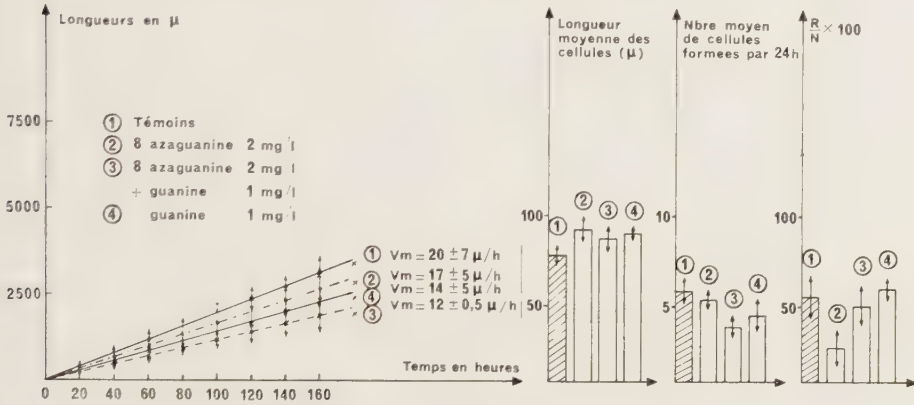


FIG. 41. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Action de la 8-azaguanine (2 mg/l) et de la guanine (1 mg/l) sur la croissance et la ramification du protonéma.

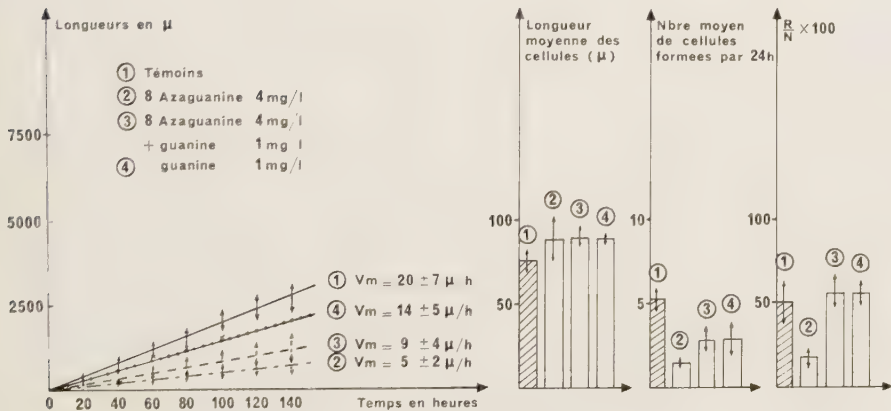


FIG. 42. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Action de la 8-azaguanine (4 mg/l) et de la guanine (1 mg/l) sur la croissance et la ramification du protonéma.

— La 8-azaguanine a, sur les mitoses obliques du protonéma de *Ceratodon*, le même effet que sur le prothalle des fougères : elle empêche la croissance bidimensionnelle (RAGHAVAN, 1965, 1966). Ce résultat est favorable à l'hypothèse d'une analogie entre les deux phénomènes.

**B. — Action de la D-actinomycine
sur la morphogenèse du protonéma
de *Ceratodon purpureus* (Brid.) cultivé à l'obscurité.**

Les expériences ont seulement été réalisées à l'obscurité, car la D-actinomycine est photolabile (BILL DAVIS, 1968). Cette photoréduction rend le problème plus complexe, puisque l'on est en droit de se

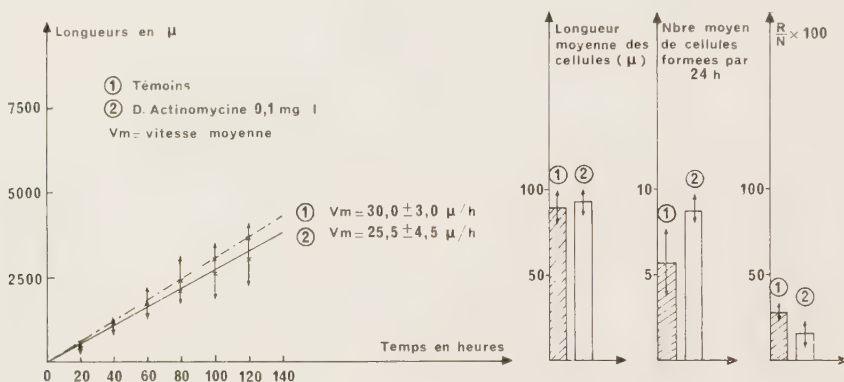


FIG. 43. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité.

Action de la D-actinomycine sur la croissance et la ramification du protonéma.

demander si l'effet observé est dû au composé lui-même ou à l'un de ces produits de dégradation.

En absence de lumière, à 10^{-4} g/l l'actinomycine ne modifie pas la vitesse de croissance (fig. 43). Le rythme des mitoses perpendiculaires et l'élongation cellulaire restent constants.

Le pouvoir de ramification, au contraire, diminue et atteint 16 au lieu de 28 pour les témoins. Une spécificité analogue à celle de la 8-azaguanine a donc été démontrée.

**C. — Action de la ribonucléase sur la morphogenèse
du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Brid.).**

a) Cultures à l'obscurité. — Les résultats obtenus avec la ribonucléase sont en tout point comparables à ceux obtenus avec la D-actinomycine. Pour des concentrations allant de $2 \cdot 10^{-1}$ g/l à $5 \cdot 10^{-1}$ g/l, le rythme des mitoses perpendiculaires, la longueur moyenne des cellules et la vitesse de croissance restent inchangés (fig. 44).

Au contraire, le rapport R/N passe de 70 pour les témoins à 37 en présence de ribonucléase à $5 \cdot 10^{-1}$ g/l : l'inhibition est donc voisine de 60 %. La figure 45 résume les résultats obtenus à diverses concentrations de l'enzyme.

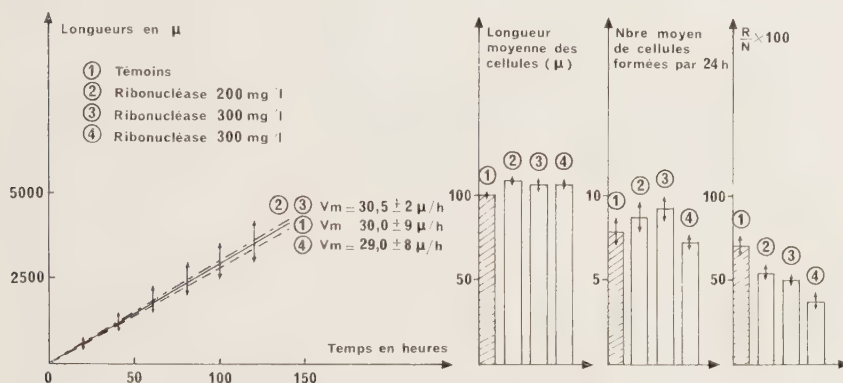


FIG. 44. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité.

Action de la ribonucléase sur la croissance et la ramification du protonéma.

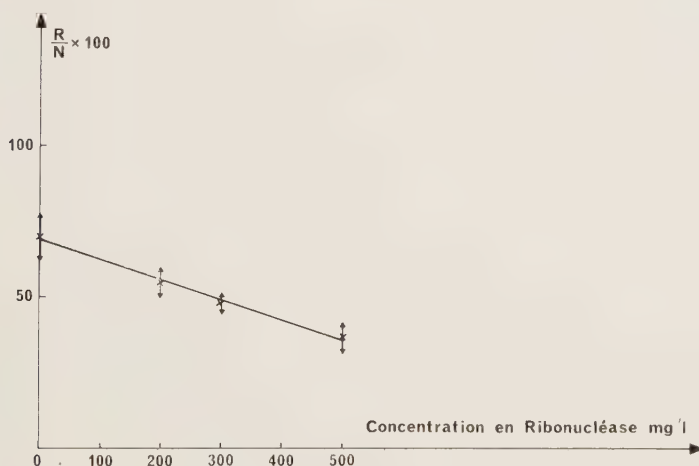
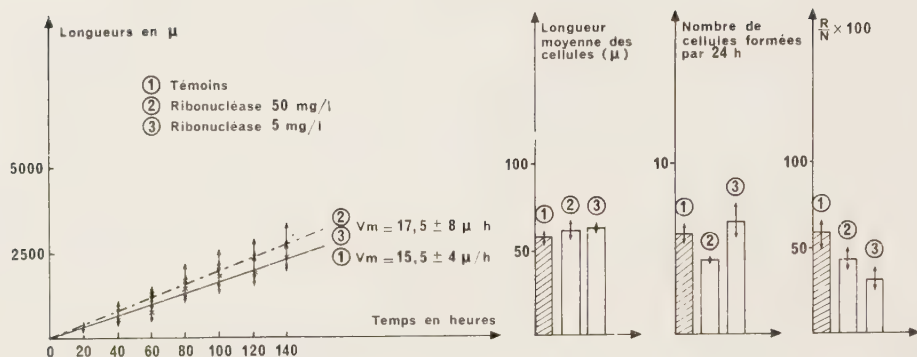


FIG. 45. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité.

Action de la ribonucléase à différentes concentrations sur le pouvoir de ramification des axes.

b) Cultures à la lumière (éclairage 800 lux). — La ribonucléase agit à des concentrations dix fois plus faibles qu'à l'obscurité ($5 \cdot 10^{-2}$ g/l au lieu de $5 \cdot 10^{-1}$ g/l); son action est cependant identique. La vitesse d'allongement, le rythme des mitoses perpendiculaires, la longueur moyenne des cellules ne sont pas modifiés (fig. 46).

FIG. 46. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à 800 lux.

Action de la ribonucléase sur la croissance et la ramification du protonéma.

Conclusions. — Des acides ribonucléiques particuliers contrôlent les mitoses obliques puisque celles-ci sont supprimées par la 8-azaguanine, la D-actinomycine et la ribonucléase.

Ces résultats permettent d'établir un parallèle entre la ramification des filaments protonématiques et la croissance bidimensionnelle d'un prothalle de fougère. RAGHAVAN et coll. mettent en évidence une inhibition de la croissance dans la deuxième dimension en présence des mêmes inhibiteurs. Pour confirmer cette idée, il sera intéressant d'étudier la croissance de protonéma thalloïde présent chez certaines Bryales, comme le *Tetraphis* ou les Andréales qui, en quelque sorte, constitueraient un terme de passage entre un prothalle et un protonéma filamenteux.

Les concentrations en inhibiteur, permettant d'obtenir une même inhibition (50 % par exemple), sont dix fois plus faibles à la lumière qu'à l'obscurité.

Il semble donc que certaines chaînes de biosynthèse soient plus sensibles aux inhibiteurs lorsque les organismes présentent une assimilation chlorophyllienne.

CHAPITRE VI

RAMIFICATION ET BOURGEONNEMENT A L'OBSCURITÉ DU PROTONÉMA DES BRYALES

La lumière est indispensable à la caulogenèse (MITRA et ALLSOPP, 1959; BOPP, 1965). Toutefois, BELKENGREN (1962) obtenait des bourgeons chez l'*Amblystegium riparium*, entièrement développé à l'obscurité et en présence de sucre. Or, le protonéma de cette espèce demeurerait ramifié dans de telles conditions.

A partir de ces données, on peut supposer que la ramification des filaments protonématiques est une première étape qui, obligatoirement, doit précéder l'apparition des bourgeons. Une analyse expérimentale de cette hypothèse est possible, chez les espèces où nous maîtrisons à volonté la ramification du protonéma.

I. — DÉMONSTRATION DU ROLE INDISPENSABLE DE LA RAMIFICATION DANS LA CAULOGÉNÈSE

Les expériences sont réalisées sur des protonémas cultivés à l'obscurité. Dans ces conditions, nous savons (chap. V) que les filaments protonématiques de *Funaria* se ramifient sous l'action de l'acide traumatique, et ceux du *Ceratodon*, après apport de glucose au milieu de culture.

Nous décrirons successivement les résultats obtenus avec les deux espèces.

A. -- *Conditions nécessaires au bourgeonnement du protonéma de Funaria hygrometrica (Hedw.).*

Les cultures sont faites sur milieu A de KOFLER (1959) additionné de glucose (5 g/l) (indispensable à l'allongement des axes) et d'acide traumatique ($3 \cdot 10^{-3}$ g/l), qui permet une ramification pratiquement comparable à celle obtenue à la lumière (1 200 lux).

On sait également que la caulogenèse chez les Bryales est favorisée par l'acide β -indolylacétique et la kinétine (GORTON et EAKIN, 1957; SZWEYKOWSKA, 1962, 1966, 1967; BOPP et BRANDES, 1964; JAHN, 1964; SZWEYKOWSKA et HANDSZU, 1965; BOPP, 1965 *b*; BRANDES, 1967; SZWEYKOWSKA, RATAJACZAK et SCHNEIDER, 1968; BRANDES et KENDE, 1968).

Des apports de ces deux substances sont faits au vingtième jour après l'ensemencement, sous forme de blocs d'agar de 80 mm³ environ, déposés directement sur les jeunes colonies.

On réalise alors huit séries d'expériences, résumées dans le tableau 47, qui permettent de préciser les rôles respectifs des diverses substances : acide traumatique, kinétine et AIA.

TABLEAU 47. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à l'obscurité. Influence de la composition du milieu de culture sur la ramification et le bourgeonnement du protonéma. (+, — = présence ou absence de bourgeons dans le milieu.)

SÉRIES	MILIEU DE CULTURE ADDITIONNÉ (+) OU NON (—) DE			RÉSULTATS
	Acide trauma- tique 0,13.10 ⁻⁴ M	Kinétine 0,28.10 ⁻⁴ M	A.I.A. 0,57.10 ⁻⁶ M	
A	+	+	+	Nombreuses ramifications. Nombreux bourgeons mal différenciés.
B	+	—	+	Nombreuses ramifications, aucun bourgeon.
C	+	+	—	Nombreuses ramifications, aucun bourgeon.
D	+	—	—	Nombreuses ramifications, aucun bourgeon.
E	—	—	—	Quelques ramifications basales. Aucun bourgeon.
F	—	+	+	Quelques ramifications basales. Quelques bourgeons.
G	—	+	—	Quelques ramifications basales. Aucun bourgeon.
H	—	—	+	Quelques ramifications basales. Aucun bourgeon.

a) Mise en évidence du rôle de la ramification dans la caulogenèse.

Il est possible d'obtenir à volonté des bourgeons de *Funaire* sur des cultures maintenues constamment à l'obscurité (série A).

Les séries B, C et D démontrent que l'acide traumatique est un facteur de ramification, non de bourgeonnement. Les deux phénomènes ne sont pas obligatoirement liés. Ils représentent deux étapes à déterminisme différent sur la voie de l'organogenèse. Cependant, la caulogenèse proprement dite est impossible si les conditions indis-

pensables à la réalisation de la ramification ne sont pas satisfaites.

Le comportement des séries E, F, G, H, ne contredit pas la conclusion précédente : bien au contraire. On sait (chap. I) qu'à la base des longs filaments nus, dans 58 % des cas, des rameaux courts, inhibés, sont engendrés au voisinage de la spore. En présence du mélange kinétine et AIA ils forment des bourgeons.

b) Mise en évidence, pour la caulogenèse, du rôle inducteur d'un mélange en proportions définies d'AIA et de kinétine. — 1° *Aux concentrations utilisées*, la présence simultanée d'auxine et de kinétine est obligatoire pour qu'apparaissent des bourgeons, donc pour que se réalise la deuxième étape de l'organogenèse. Les deux substances employées isolément sont sans effet.

A la lumière, au contraire, la kinétine employée seule permet, d'une part, une différenciation plus précoce des bourgeons (JAHN, 1964; BRANDES, 1967) qui apparaissent au quatorzième jour, voire même au dixième jour de culture au lieu du vingt et unième sur les témoins, et, d'autre part, une augmentation de leur nombre (JAHN, 1964).

A l'obscurité, l'apport d'acide β -indolylacétique et de kinétine ne modifie pas la vitesse de croissance du protonéma. 4 à 5 jours plus tard, on observe la première différenciation : l'apparition de rameaux courts (200 μ environ) et épais, différents de ceux nés en présence d'acide traumatique seul.

Pour vérifier si l'inhibition de croissance de ces ébauches était de nature corrélative, nous les avons isolées. Les expériences n'ont pu être réalisées que dans un très petit nombre de cas, étant donné l'enchevêtrement des filaments protonématiques dans les cultures. On n'a jamais observé de reprise de croissance. Il ne s'agirait donc pas de ramification simplement inhibée.

2° *D'après les travaux de SKOOG*, on sait que, dans certaines cultures de tissus, la caulogenèse est aussi sous la dépendance de l'auxine et de la kinétine. De plus, ces substances doivent être présentes à des doses déterminées, dont le rapport est également précis. Nous avons recherché si cette loi se vérifiait sur la Funaire et quelles étaient les concentrations les plus favorables à l'induction de bourgeons sur le protonéma cultivé en présence d'acide traumatique.

Le tableau 48 résume les résultats obtenus :

— Les concentrations absolues ne semblent pas importantes par elles-mêmes; si l'AIA est appliqué sous forme de bloc d'agar, renfermant 10^{-5} à 10^{-1} g/l d'auxine, les résultats sont comparables. Il en est de même en présence de 10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , 1 g/l de kinétine.

— Mais les ébauches de bourgeons n'apparaissent que si les concentrations d'auxine et de kinétine sont dans un rapport voisin de 1/100. Il faut néanmoins une dose minimale de substances actives ($5,7 \cdot 10^{-8}$ M (10^{-5} g/l) d'auxine et $4,4 \cdot 10^{-6}$ M (10^{-3} g/l de kinétine) pour que la réponse soit positive. Il est bien évident que les molécules efficaces sont celles qui diffusent à partir du bloc d'agar; donc les

TABLEAU 48. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Culture à l'obscurité sur milieu additionné d'acide traumatique (3 mg/l).
Action de l'auxine et de la kinétine sur la naissance des bourgeons.

AUXINE ($\mu\text{g/l}$) KINÉTINE ($\mu\text{g/l}$)	1	10	100	1 000	10 000	1 000 000
1	0					
10	0	0				
100	0	0	0			
1 000	0	+	Rares.	0		
10 000		0	+++	0	0	
100 000			Rares.	+	0	0
1 000 000				0	+	

concentrations utilisées ne sont que des valeurs relatives. En fait, le bloc d'agar ayant environ un volume de 80 mm³, la goutte de milieu correspondant à 200 mm³, les concentrations minimales réellement actives sont 4.10⁻⁶ g/l d'auxine et 4.10⁻⁴ g/l de kinétine.

Conclusions. — Comme chez les plantes supérieures, la kinétine est un facteur très important dans la caulogénèse du protonéma. Son rôle a été souligné par de nombreux auteurs (GORTON et EAKIN, 1957; GORTON, SKINNER et EAKIN, 1957; MALTZAHN, 1959; MITRA et ALLSOPP, 1959 *a, b*; SZWEYKOWSKA, 1962; JAHN, 1965; IWASA, 1965; SCHRAUDOLF, 1966; BRANDES, 1967), sur des espèces variées comme *Tortella caespitosa*, *Pohlia nutans*, *Splachnum ampullaceum*, *Funaria hygrometrica* et *Ceratodon purpureus*. Dans la majorité des cas, les expériences étaient réalisées à la lumière. De plus, on sait que, dans les cultures de tissus, si l'AIA favorise la rhizogénèse, la kinétine stimule la caulogénèse. Néanmoins, elle demeure sans effet si le tissu ne contient pas d'AIA endogène ou n'en reçoit pas de l'extérieur. Pour GORTON et coll. (1957), la mise en place de la polarité responsable de l'organogénèse et de l'allongement d'un bourgeon se fait par l'intermédiaire d'un gradient auxinique qui peut être obtenu expérimentalement par une concentration élevée en auxine dans le milieu (WETTSTEIN, 1953; BÜNNING, 1953).

Comme chez les plantes supérieures, les deux hormones doivent être dans un rapport de concentrations déterminé.

B. — Conditions nécessaires au bourgeonnement du protonéma de *Ceratodon purpureus*.

Le glucose, sans lequel il n'y a ni ramification, ni bourgeonnement, est indispensable à la première étape de l'organogenèse. Il a donc une action comparable à celle de l'acide traumatique chez la *Funaire*.

II. — ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCIATION DES BOURGEONS

Au cours des expériences que nous avons décrites jusqu'à présent, nous ne nous sommes pas attachés à analyser les différentes étapes de la formation d'un bourgeon. Or, entre le rameau court et la pousse

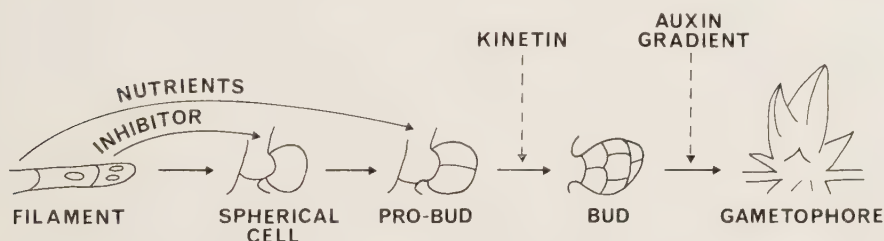


FIG. 49. — Schéma du mécanisme de la formation des bourgeons sur le protonéma de mousses.

feuillée, il y a de nombreux stades intermédiaires qui peuvent être modifiés par différents modes de culture, à la lumière ou à l'obscurité. Divers traitements peuvent influencer également la différenciation des ébauches caulinaires : c'est ce que nous allons étudier maintenant.

GORTON et EAKIN (1957), SZWEYKOWSKA (1966), caractérisent l'apparition des ébauches caulinaires sur des protonémas de *Tortella caespitosa* et *Ceratodon purpureus* cultivés à la lumière, par un certain nombre d'étapes schématisées dans la figure 49.

À l'obscurité, nous verrons que les étapes de la différenciation des bourgeons sont pratiquement identiques, mais que certaines conditions doivent être respectées :

a) le protonéma doit être ramifié : apport indispensable de glucose pour le *Ceratodon* ou d'acide traumatique pour la *Funaire*;

b) l'AIA et la kinétine sont nécessaires pour induire l'organogenèse des jeunes rameaux courts;

c) les très jeunes bourgeons engendreront des plantes feuillées seulement s'ils sont repiqués sur un milieu dépourvu de substances de croissance.

A. Différentes étapes de la différenciation des bourgeons.

Les expériences ont été suivies à la fois sur la *Funaire* et le *Ceratodon*. Les résultats obtenus sont identiques avec les deux espèces; les résultats seront donc seulement décrits pour la *Funaire*.

a) Nous avons déjà vu (paragraphe I) que 4 à 5 jours après l'apport du mélange auxine-kinétine des rameaux courts et épais apparaissent sur les filaments du protonéma (fig. 50). La naissance d'un bourgeon n'influence pas la vitesse de croissance et la ramification du rameau qui le porte.

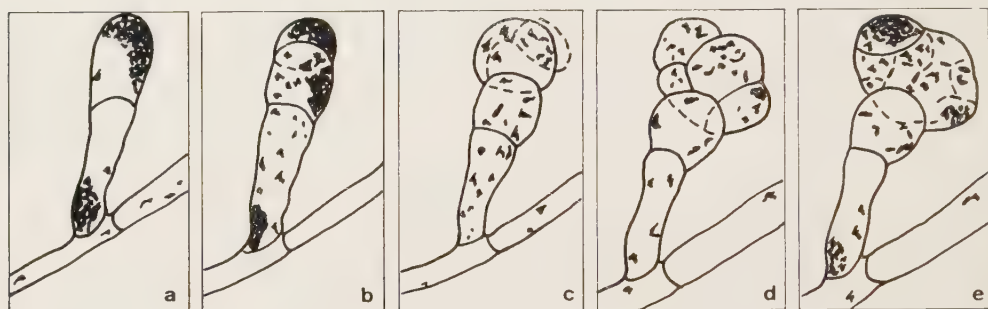


FIG. 50. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Cultures à l'obscurité en présence d'acide traumatique (3 mg/l). Apport d'auxine et de kinétine au vingtième jour de la culture (14-11-1965). Différentes étapes de l'initiation des ébauches de bourgeons. Observations réalisées à partir du trentième jour (24-11-1965).

b) Après cloisonnement, les cellules des rameaux courts deviennent isodiamétriques (fig. 50 b, c, d). Le rapport largeur sur longueur passe de 0,5 à 1,0. Les leucoplastes sont plus nombreux et plus gros que dans les rameaux végétatifs du protonéma.

c) La cellule apicale se cloisonne alors dans les trois dimensions de l'espace (fig. 50 e), engendrant ainsi une sorte de « morula ».

L'organogenèse est donc précédée par des modifications importantes de la polarité cellulaire, analogues à celles décrites par BÜNNING et coll. (1953, 1956).

Parfois, un massif cellulaire comparable prend naissance au niveau d'une cellule intercalaire. Ceci n'est pas sans rappeler ce que l'on observe chez le gamétophyte des Filicinées (DE PARÈS, 1966); chez ces dernières, la spore engendre un filament composé de quelques cellules; puis la cellule terminale se recloisonne pour former le prothalle. Parfois, également, ce sont des cellules intercalaires qui se réorganisent et forment, par divisions obliques, la spatule à partir de laquelle

s'ébauche le prothalle. Il semble donc y avoir une concurrence entre la cellule apicale et les cellules intercalaires, pour acquérir l'aptitude à se diviser obliquement. Parfois, les deux évolutions coexistent sur le même rameau; mais la cellule apicale évolue toujours plus rapidement; ce qui est logique puisque, dans un filament protonématique, elle est la seule qui soit capable de croître et de se diviser.

d) **Beaucoup plus tard (15 jours environ)**, quelques rares feuilles peuvent être visibles près du sommet des massifs qui ont pris la forme d'une grappe irrégulière rappelant les « colonnettes » de cellules décrites par KOFLER (1951) et BOPP (1965), après un traitement par l'auxine à trop forte concentration. Les massifs intercalaires se multiplient souvent de manière anarchique; des systèmes secondaires se développent sur les ébauches primaires mais ne s'organisent pas.

e) **Le transfert, sur milieu dépourvu d'auxine et de kinétine**, provoque presque toujours la transformation de ces massifs irréguliers en pousse feuillée (fig. 51); sur le milieu inducteur ils seraient demeurés indifférenciés.

Des observations identiques avaient été faites par JAHN (1964) sur des cultures à la lumière : le repiquage sur milieu dépourvu de toutes substances de croissance est indispensable à une organogenèse normale des ébauches caulinaires.

Cependant, si les jeunes ébauches comptent seulement 4 à 8 cellules, leur différenciation est encore



FIG. 51. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Plante feuillée engendrée à l'obscurité par un bourgeon après son transfert sur milieu de base (culture d'un mois).

réversible; après repiquage sur milieu dépourvu d'auxine et de kinétine, les cellules de l'ébauche retrouvent une croissance polarisée et engendrent à nouveau des filaments protonématiques (fig. 52). Au contraire, si l'explant comprend plus de 8 cellules, il évolue, après le repiquage, en pousse feuillée. Ces observations sont en accord avec celles de BOPP (1965), pour des cultures faites à la lumière. De même, de très nombreux auteurs (GOEBEL, 1898 a; GURLITT, 1918; BUCH, 1920; BAUER, 1942; BOPP, 1953; GORTON et EAKIN, 1957) notent le retour à des formes protonématiques à partir de cellules de jeunes ébauches. Pour BOPP (1965), la potentialité réversible des cellules apicales existe seulement pendant les toutes premières phases du développement, mais dès que la première formation des feuilles est amorcée elle n'est plus possible.

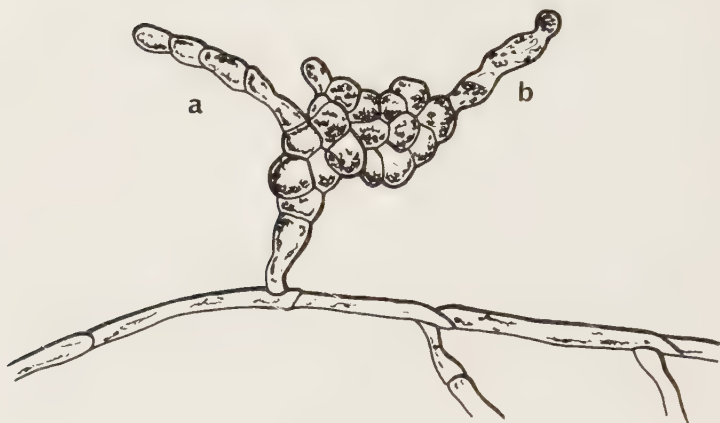


FIG. 52. — *Funaria hygrometrica* (Hedw.).

Dédifférenciation des ébauches caulinaires
après transfert sur un milieu sans auxine-kinétine.

f) **Les bourgeons se forment sans ordre sur le protonéma.** — On ne retrouve plus l'existence du « rond de sorcière » qui caractérise les cultures à la lumière (BOPP, 1965). Ceci est assez logique puisque, à l'obscurité, leur situation ne dépend pas de la mise en place du caulonéma qui n'existe pas.

g) **Nous avons repiqué des cellules isolées,** prélevées sur des morula comprenant à l'origine plus de 8 cellules. Normalement, ces cellules sont totalement différenciées et contribuent à l'édification des jeunes pousses feuillées. Or, lorsqu'elles sont isolées, elles acquièrent une polarité typique et engendrent un filament protonématique. Il semblerait donc que ce soit l'association étroite entre plusieurs cellules qui les maintienne dans un état différencié indispensable à l'évolution organogène.

B. — *L'aptitude au bourgeonnement est fonction de l'âge du protonéma.*

1° A l'obscurité, la mise en place de bourgeons sur un protonéma se fait en deux étapes à caractères physiologiques particuliers (tableau 53).

a) Un premier temps de « maturité » du protonéma, correspondant à ce que BOPP et BRANDES (1964), BOPP (1965 a) décrivent en terme de « grandeur critique » et qui est au minimum de 19 jours, comme le montre la figure 54.

b) Un deuxième temps d'induction au bourgeonnement proprement dit, pendant lequel les cellules adultes du protonéma réagissent avec

TABLEAU 53. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).
Culture à l'obscurité sur milieu A glucosé (5 g/l).
Détermination de l'âge minimum des germinations
pour l'aptitude au bourgeonnement.

SÉRIES	AGE (en jours) DES GERMINATIONS AU MOMENT DU TRAITEMENT AUXINE (100 µg) + KINÉTINE (10 000 µg)	TEMPS (en jours) NÉCESSAIRE À L'APPARITION DES BOURGEONS APRÈS LE TRAITEMENT	AGE (en jours) DES CULTURES LORS DE L'APPARITION DES PREMIERS BOURGEONS
	(A)	(B)	(A) + (B)
I	4	10	14
II	5	9	14
III	9	7 à 9	14 à 16
IV	10	9	19
V	14	5 à 7	19 à 22

les substances de croissance, et qui est au minimum de 5 jours (fig. 54).

2° L'âge physiologique minimum d'un protonéma nécessaire à la caulogénèse est égal au temps de maturité d'induction augmenté du

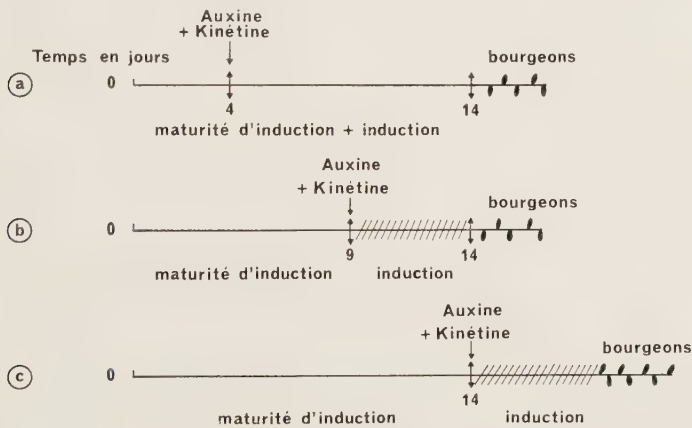


FIG. 54. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Culture à l'obscurité sur milieu A glucosé (5 g/l).
Mise en évidence d'un temps de maturité et d'un temps d'induction
dans la caulogénèse.

temps d'induction proprement dit, soit 14 jours au total (fig. 54). Lorsqu'il est atteint pour l'ensemble du protonéma, les bourgeons se forment à partir de cellules d'âge très varié : rameaux courts inhibés bien avant l'apport de substances de croissance ou néoformations sur des ramifications d'ordre un ou deux.

3° La différenciation cellulaire au niveau des ébauches caulinaires

est très labile, puisque toute cellule isolée reprend après rajeunissement une croissance protonématique. Ce déterminisme cellulaire assez fragile est à mettre en parallèle avec le pouvoir très intense de régénération de tous les organes gamétophytiques des Bryales. Chaque cellule se différencie très rapidement pour donner naissance à du chloronéma.

Nos recherches montrent pour la première fois que, malgré les points de divergence que nous nous sommes efforcés de mettre en relief, les grandes étapes de la caulogenèse sont identiques à la lumière et à l'obscurité. Or, BRANDES et BOPP (1965) pensent qu'à la lumière la mise en place des bourgeons demande une activation génique à un moment précis du développement. Ils ont, en effet, mis en évidence que la D-actinomycine bloquait l'organogenèse caulinaire dans ses premiers stades.

Nous savons, d'autre part (chap. V), que la D-actinomycine supprime les divisions obliques au niveau des cellules du protonéma. *La croissance dans la deuxième dimension est spécifiquement inhibée.*

Nous avons voulu vérifier si, à l'obscurité, la D-actinomycine supprimait également la formation des bourgeons, donc les mitoses dans la troisième dimension. S'il en est ainsi, cela signifiera que cette inhibition empêche l'activation génique nécessaire à la réalisation des diverses étapes de la morphogenèse du protonéma, à savoir :

- les divisions obliques (croissance bidimensionnelle; chap. V);
- les divisions dans la troisième dimension : responsables des ébauches caulinaires.

III. — ACTION DE LA D-ACTINOMYCINE SUR LE BOURGEONNEMENT

Des cultures de *Funaire*, développées à l'obscurité pendant 20 jours sur milieu glucosé additionné d'acide traumatique ($3 \cdot 10^{-3}$ g/l), sont réparties en deux séries :

- l'une (A) reçoit un apport du mélange auxine-kinétine aux concentrations habituelles;
- l'autre (B) reçoit, en plus, de l'actinomycine à la concentration de $1,5 \cdot 10^{-1}$ g/l.

Dès le dixième jour suivant le traitement, les premières ébauches de bourgeons apparaissent sur les témoins (A). En B, les rameaux courts évoluent en rameaux longs, en conservant approximativement le même nombre de cellules. Les cellules s'allongent mais ne se divisent pas. La croissance reste polarisée et ne devient jamais isodiamétrique.

La figure 55 résume ces résultats. En abscisse, on porte le temps en jours après le traitement à l'actinomycine D. L'échelle des

ordonnées représente le rapport l/L de la largeur des ébauches sur leur longueur. Sur les témoins, ce rapport s'élève rapidement pour passer de 0,05 à 0,7. Au contraire, en présence d'actinomycine le rapport ne s'élève pas : la croissance isodiamétrique est donc inhibée. Donc la D-actinomycine inhibe la croissance dans la troisième dimension, et supprime la nouvelle évolution morphologique programmée, qui conditionne la caulogenèse.

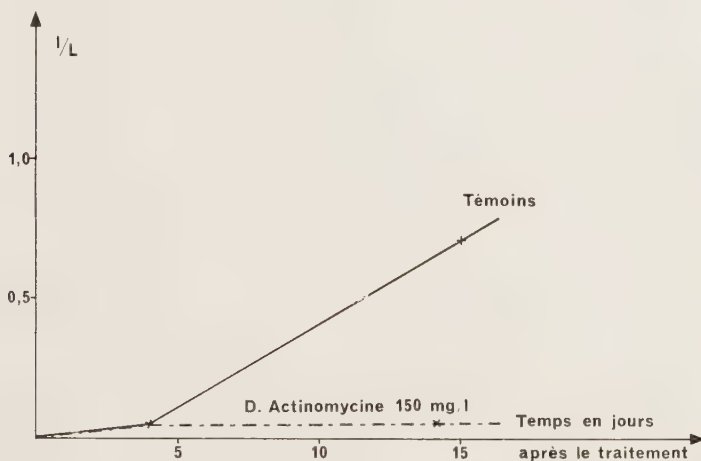


FIG. 55. — *Ceratodon purpureus* (Brid.).

Inhibition par l'actinomycine de la croissance en largeur des pro-bourgeons.

Conclusions. — 1° L'actinomycine agit donc à l'obscurité comme à la lumière. Ceci laisse supposer qu'à l'obscurité également, la formation des bourgeons a pour origine l'activation d'une information génétique à un moment bien défini du développement, comme le suggèrent BRANDES et BOPP (1964).

2° L'actinomycine maintient la polarité cellulaire en empêchant la croissance isodiamétrique des cellules. La nouvelle information génétique est peut-être, pour une cellule donnée, l'acquisition de l'aptitude à une croissance isodiamétrique.

3° La naissance d'un bourgeon, chez une mousse cultivée à l'obscurité, peut se décomposer au moins en trois étapes :

a) des rameaux courts apparaissent sur les axes protonématiques. Le déterminisme de ces rameaux est particulier puisqu'ils arrêteront très tôt leur croissance en longueur (2 ou 3 cellules au maximum). Pour GORTON et EAKIN (1957), et SZWEYKOWSKA (1966), le protonéma synthétiserait un inhibiteur qui diffuserait dans le milieu et serait à l'origine de l'inhibition cellulaire.

b) les deux cellules terminales des rameaux courts croissent en largeur et deviennent isodiamétriques.

c) la cellule apicale, dans la majorité des cas, se multiplie alors

activement pour donner naissance à un massif cellulaire ou « morula » qui s'organisera en plante feuillée.

4° Chaque étape semble être sous le contrôle d'un facteur chimique différent :

— la naissance des ramifications est conditionnée par la présence, dans le milieu, d'acide traumatique dans le cas de la *Funaire* ou de glucose pour le *Ceratodon*;

— l'évolution des rameaux courts en bourgeons est contrôlée par le mélange auxine-kinétine. Employées seules, ces hormones se sont révélées sans action; à la lumière, l'apport de kinétine seule est suffisant; les cellules doivent alors être capables de synthétiser l'auxine.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

LA NOTION DE DOMINANCE APICALE CHEZ LE PROTONÉMA DES BRYALES : COMPARAISON AVEC LES CHAMPIGNONS ET LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

Un des principaux buts de ce travail était de préciser les caractères et le mécanisme des corrélations de croissance susceptibles d'exister dans le protonéma de Bryales. Aucun phénomène de cette sorte n'avait jusqu'à présent été signalé dans ce groupe de végétaux inférieurs. Le terme de dominance apicale avait seulement été utilisé par BOPP (1965 *b*) chez les Polytrichacées, et dans un sens très spécial : les extrémités en croissance du protonéma inhiberaient la néoformation de bourgeons feuillés à leur voisinage. Chez le *Polytrichum* (BOPP, 1952) et le *Physcomitrium* (NOGUCHI et MIYATA, 1957; WOESLER, 1933), les jeunes bourgeons ne se forment en effet que vers le centre de la culture, le plus loin possible des apex protonématiques en croissance. Dans ce cas, la kinétine permet d'obtenir des bourgeons à la périphérie : elle lève donc en partie cette inhibition corrélative qu'on peut ainsi, par analogie avec le comportement des plantes supérieures, assimiler à une dominance apicale (WICKSON et THIMANN, 1960; HUGON, 1967). Cependant, le langage ne saurait faire préjuger des mécanismes puisqu'il s'agit de corrélations d'inhibition s'établissant entre des cellules à devenir différent : les unes appartiennent au protonéma, les autres sont à l'origine des ébauches caulinaires.

Il nous a semblé nécessaire d'étudier d'abord des problèmes plus simples, comme les corrélations de croissance susceptibles d'exister dans un chloronéma entre les axes principaux et les ramifications qu'ils portent. Les bourgeons, qui sont à l'origine du gamétophyte feuillé, représentent un stade avancé de la morphogenèse, et des rapports complexes doivent exister entre eux et le protonéma ramifié.

Quoi qu'il en soit, la notion de dominance apicale a été établie chez les végétaux supérieurs, et répond à des critères très précis, que nous avons définis dans l'introduction. Dans le thalle jeune des champignons LARPENT (1966) a pu mettre en évidence de telles corrélations d'inhibition répondant aux mêmes critères. Il semble, d'après ses

expériences, que des détournements trophiques par les cellules en croissance active soient en grande partie responsables de cette dominance apicale; ce qui justifie pleinement l'emploi des termes, puisque l'importance de certaines carences, banales ou non, est démontrée pour les phanérogames (CHAMPAGNAT, 1965); GREGORY et VEALE, 1957).

A-t-on le droit de les utiliser pour le protonéma des Bryales ? Si les mécanismes réglant les corrélations d'inhibition sont en partie au moins analogues chez tous les organismes, il est légitime d'utiliser les mêmes termes dans tous les cas. Si, au contraire, l'établissement d'une hiérarchie entre rameaux, dans le système filamenteux des Bryales, est de nature tout à fait particulière, il n'est plus légitime de le faire.

On ne peut pas, sans précaution, comparer le protonéma de Bryales et l'ensemble des rameaux d'un végétal supérieur : l'axe principal et les ramifications latérales du premier n'étant pas les homologues d'une tige porteuse de bourgeons axillaires plus ou moins développés.

Chez les organismes supérieurs, certaines corrélations sont liées à la différenciation des cellules et à leur groupement en tissus et en organes physiologiquement spécialisés : ainsi, la croissance du système aérien est liée à celle du système racinaire par un ensemble de corrélations variées (WASSINK et RICHARDSON 1951; RICHARDSON, 1957); l'inverse est également vrai. Les relations entre organes complexes sont évidemment absentes dans le protonéma des Bryales, mais il est possible qu'elles existent lorsque sont formés des bourgeons le long d'un même filament : la présence d'un bourgeon excluant soit la naissance d'une nouvelle ébauche sur le même rameau latéral (JAHN, 1964), soit celle des organes de reproduction (archégones) (HOLDHEIDE, 1938).

Il semble aussi que les plantes supérieures, à port dressé, soient beaucoup plus indépendantes du milieu extérieur qu'un protonéma de Bryales en contact intime par toute sa surface avec le substrat. On sait en effet, comme en témoignent les expériences de BRANDES (1967), BRANDES et KENDE (1968) avec la phénylalanine marquée, que les filaments protonématiques absorbent sur toute leur longueur les éléments nutritifs du milieu de culture.

Il semble, au contraire, que le thalle des champignons puisse être considéré comme l'homologue d'un protonéma, à l'autotrophie près. Leurs relations avec le milieu sont comparables, même si chez les Mycètes il est difficile de savoir si toute la surface du thalle absorbe les éléments nutritifs ou si certaines cellules sont, à cet égard, privilégiées (LARPENT, 1966).

Toutefois certains facteurs, responsables des phénomènes de corrélation, se retrouvent à la fois chez les végétaux supérieurs, les champignons et le protonéma de Bryales :

1° La nutrition agit sur la morphologie du protonéma comme sur celle du thalle de champignons. Une carence trophique ou énergétique (diminution de l'éclairement) renforce considérablement la présence de l'apex principal. Une diminution de l'éclairement provoque d'abord

l'arrêt de l'allongement d'un nombre croissant de rameaux latéraux; le rythme de leur formation est aussi fortement diminué. Si l'on supprime la lumière, ou si l'on appauvrit le milieu en glucose pour certaines espèces cultivées à l'obscurité, les ébauches latérales ne se forment plus et on obtient des filaments protonématiques nus. De même, BERTHIER (1966) montre que, sur l'axe feuillé de *Fontinalis*, la densité d'initiation et la croissance anticipée des bourgeons augmentent avec l'éclairement. Or, chez le lin, GREGORY et VEALE (1957) montrent que le degré de développement, voire même la formation des ébauches axillaires, dépend dans une très large mesure de la nutrition des plantes et de leur « vigueur ». Chez *Cicer arietinum*, CHAMPAGNAT (1952) et HUGON (1960) observent que la croissance des bourgeons de base est facilement contrôlée par la nutrition générale de la plante.

2° L'ablation des organes dominants permet la reprise de croissance des organes dominés. Les résultats obtenus avec la Funaire montrent d'ailleurs que l'apex principal n'agit pas seul, mais que l'ensemble des rameaux en croissance peut inhiber un sommet principal ou une ébauche avortée. Ceci est tout à fait semblable aux faits observés par HUGON (1967) sur *Cicer arietinum*, et aux résultats de LARPENT (1966) sur *Rhizopus nigricans*.

Essais d'interprétation du mécanisme de la dominance apicale chez les Bryales au stade protonématique.

Les connaissances acquises chez les plantes supérieures et les champignons avaient été pour nous un point de départ de réflexion et d'expériences.

a) **Lumière et substances hormonales.** — Chez les mousses, les cellules du protonéma autres que la cellule apicale sont capables de synthétiser des substances hormonales telles que l'auxine (BOPP, 1953; JAHN, 1964). Ces substances sont cependant sans action sur la morphologie du protonéma (chap. II).

Lorsqu'on parle de substances morphogènes chez les Bryales, on pense au contraire à des molécules plus spécialisées, qui n'ont pu pour l'instant être remplacées par aucun composé connu, mais qui malheureusement n'ont pas été identifiées; elles se formeraient à la lumière, comme MITRA et ALLSOPP (1959), MACHLIS (1962) en formulent l'hypothèse.

BOPP (1963), BOPP et KLEIN (1966), KLEIN (1967) ont mis en évidence des facteurs de croissance (F et H) excrétés par le protonéma et diffusant dans le milieu. Le facteur F induirait la formation du caulonéma, le facteur H promouvant celle des bourgeons.

Nos observations sont favorables à cette interprétation.

1° Il est vraisemblable que la lumière n'agit pas seulement sur la ramification comme facteur nutritionnel.

S'il en était ainsi, on pourrait aisément la remplacer par un apport de substances organiques variées dans le milieu. Or, on n'y parvient toujours que partiellement, par exemple par des additions de glucose ou d'acide traumatique. Les rameaux latéraux réapparaissent, mais un certain nombre d'entre eux restent toujours à l'état d'ébauches. A la lumière, au contraire, tous ceux qui apparaissent sont en croissance active.

Ce comportement des Bryales à l'obscurité n'est pas sans rappeler celui des champignons, comme le *Neurospora crassa* ou le *Rhizoctonia solani* où, malgré tous les essais d'enrichissement du milieu, une proportion plus ou moins élevée (20 % à 40 %) de ramifications ne se développent pas. Deux interprétations de ces phénomènes sont possibles.

α) Il existe un métabolite particulier, encore inconnu, favorable à la ramification. Ceci paraît peu probable puisque l'ensemble des conditions d'alimentation agit sur la morphologie du protonéma. Il n'en est peut-être pas de même chez les Bryales si on se souvient de la spécificité des facteurs de ramification du protonéma à l'obscurité : alors que l'acide traumatique agit sur la *Funaire*, il est sans action sur le *Ceratodon* et le *Leptobryum*; de même, le glucose donne des résultats positifs seulement sur le *Ceratodon*. Malgré de multiples essais, il ne nous a jamais été possible d'induire la ramification chez le *Leptobryum* ou le *Buxbaumia* à l'obscurité. Des observations comparables avaient été faites par PRINGSHEIM (1935), qui pensait que ces réactions étaient liées à un équipement enzymatique particulier à chaque espèce.

β) Le développement des rameaux latéraux est conditionné par des synthèses d'acides nucléiques et les divisions nucléaires. L'absence de noyau au niveau de la jeune ébauche latérale (BOPP, 1966, film), ou éventuellement l'inaptitude de ce noyau à se diviser, pourrait expliquer l'avortement des ramifications. Une telle hypothèse est compatible avec les faits connus : la naissance d'une ramification est d'abord la conséquence d'une modification latérale de la membrane d'une cellule de l'axe principal. C'est seulement lorsque l'ébauche est déjà bien formée, comme nous l'avons noté dans l'introduction, que le noyau traverse la cellule principale pour se rendre à la base du jeune rameau où il se divise alors. Il est possible qu'en l'absence de lumière un petit nombre d'ébauches s'allongent et qu'aucun noyau fils ne vienne induire la croissance ultérieure. Des observations microscopiques nous ont montré en effet de nombreux exemples de rameaux très courts dépourvus de noyaux.

Ceci paraît, à première vue, incompatible avec la reprise de croissance des ébauches après isolement. En fait, il faut rappeler qu'elles sont toujours accompagnées de la cellule qui les porte, donc d'un noyau, dont l'effet de blessure provoque la division. De même, nous

avons observé que, pour qu'une reprise de croissance soit possible, il est indispensable que la portion d'axe respectée ne soit pas supérieure à 200 μ . L'action de la blessure semble donc réelle et n'est efficace que si le traumatisme est assez proche du rameau latéral inhibé.

Si l'on admet cette interprétation, un tout jeune rameau de la longueur d'une cellule, mais ne possédant pas encore de noyau, et bloqué dans son développement, ne devrait pas le reprendre après son isolement. Toutefois, des difficultés techniques nous ont empêché de réaliser cette expérience.

La lumière pourrait donc agir en stimulant les divisions nucléaires au niveau des cellules des filaments principaux.

En fait, les deux hypothèses que nous venons d'examiner ne sont pas incompatibles. Si les substances de croissance sont des effecteurs d'acides nucléiques, on peut penser que la lumière produit une substance morphogène qui stimule la synthèse d'acides ribonucléiques particuliers, le déplacement des noyaux et leur entrée en mitose, qui n'est peut-être possible qu'après ce déplacement, donc en un point déterminé de la cellule.

γ) Ce type d'inhibition de la croissance des ramifications n'exclut cependant pas l'existence de corrélations de nature différente : certaines s'arrêtent de croître à des dimensions diverses, alors qu'elles sont pluricellulaires. Dans ce cas, leur isolement sans la cellule porteuse est possible et elles reprennent toujours leur allongement. On est en droit de présumer l'existence de concurrences trophiques qui se sont établies dans les conditions défavorables de culture.

2° Des cultures, réalisées sous un faible éclaircissement, se développent en ne donnant que quelques rameaux latéraux au voisinage de la spore (effet spore). La croissance continuant, les axes restent nus. C'est seulement au bout d'un laps de temps d'autant plus long que l'éclaircissement est plus faible, qu'une deuxième vague de ramifications se manifeste. La dominance apicale disparaît partiellement. Que signifie ce temps de latence nécessaire à la naissance et à la croissance du deuxième groupe d'ébauches ? Le plus logique est de penser qu'il existe, dans la spore, les facteurs nécessaires pour permettre aux premières cellules formées de se ramifier. Puis ces facteurs s'épuisent et, sous un faible éclaircissement, ils sont resynthétisés peu à peu, redeviennent assez abondants et permettent alors la division latérale des cellules. Chez les Fougères, cet « effet spore » est décrit (STANGE, 1964) sous le terme de « spore nature ». Cet auteur montre que la croissance de la jeune germination est exclusivement conditionnée par les substances stockées dans la spore. L'importance de ces substances pour la croissance diminue graduellement en fonction du temps : les molécules synthétisées par les nouvelles cellules prenant le relais.

Chez les Bryales, sous une intensité optimale d'éclaircissement variant entre 800 et 1 200 lux selon les espèces étudiées, l'énergie lumineuse est suffisante pour que la synthèse du « facteur de ramification » soit assez rapide au niveau des cellules axiales pour prendre le relais de

l'effet spore, permettant ainsi à la ramification de se poursuivre régulièrement.

Soulignons que cette aptitude à la ramification n'est pas atteinte immédiatement par toutes les cellules. Certaines d'entre elles, comme l'apicale, même après être parvenue à ses dimensions définitives, sont incapables d'engendrer une ébauche latérale (LEPPARD et RAJU, 1965). Elle ne le devient, et seulement dans 30 % des cas, que dans des conditions particulières, après isolement par exemple. A la lumière, c'est seulement lorsqu'elle sera séparée de l'apex par trois cellules qu'elle pourra donner naissance à une ramification. On est amené à penser que, pendant ce temps :

— ou bien, elle est le siège de synthèses particulières, la conduisant à un stade physiologique nécessaire pour l'apparition d'une ébauche latérale;

— ou bien elle arrive dans une position telle qu'elle échappe à une inhibition corrélative émanant de la cellule apicale. Les résultats de nos expériences sont apparemment favorables à cette dernière hypothèse. Ils confirment qu'une cellule subapicale isolée forme toujours une ramification latérale; sur un protonéma entier, la division nucléaire responsable était donc inhibée par l'apex. Toutefois, on peut aussi penser que l'effet de blessure est, en partie au moins, responsable de la stimulation observée : il est donc impossible de choisir entre ces deux interprétations. L'existence de corrélations intercellulaires dans un protonéma est cependant probable puisque nous avons pu les mettre en évidence sur des implants comprenant six cellules, au niveau desquels l'effet de blessure n'intervient pratiquement pas. Dans ces conditions, les cellules centrales de la bouture ne portent jamais de rameaux latéraux; à leur niveau, les mitoses obliques sont donc inhibées par les cellules voisines, plus proches des points de blessure. Ces observations rejoignent celles de BOPP et BÖHRIS (1965) qui montrent qu'il n'y a pas de division intercalaire dans un protonéma entier, même si ce dernier est transféré sur un milieu neuf.

Il paraît donc difficile de considérer le protonéma comme un système de cellules indépendantes mises bout à bout. L'existence des corrélations intercellulaires et des corrélations entre axes et ramifications, telles que nous les avons décrites, plaide contre cette définition, mais pose le problème de leur déterminisme. L'hypothèse d'une action hormonale liée à l'action de la lumière est probable, mais demande de nouvelles recherches avant de pouvoir être considérée comme une évidence. Il faut cependant rappeler, une fois encore, que les molécules actives (auxines, gibbérelline et kinines) chez les végétaux supérieurs n'ont aucune action sur la ramification du protonéma des Bryales.

b) Problème des détournements trophiques. — Chez les végétaux supérieurs, comme chez les champignons, les corrélations sont en grande

partie la conséquence d'un détournement par un centre de synthèse principal. Les phénomènes de transport sont donc essentiels pour qu'elles se manifestent.

Nombreux sont les résultats qui, chez les Bryales, sont apparemment favorables à cette conception. Ainsi :

— la suppression de tous les rameaux en croissance permet à l'apex qui a cessé tout allongement de reprendre son activité;

— sur des protonémas cultivés à l'obscurité, ou sous de faibles éclairéments (400 lux), la destruction de l'apex provoque une reprise de croissance des ébauches inhibées, si la décapitation n'est pas faite à plus de 200 μ de la ramification;

— après isolement, les rameaux inhibés reprennent leur développement.

Ces faits ne prouvent cependant pas que les apex entrent en concurrence par détournement d'aliments indispensables. Certes, ils sont en général obtenus en régime de carence partielle, mais les résultats expérimentaux essayant de mettre en évidence des phénomènes de transport polarisé vers les cellules apicales ont toujours été négatifs : chaque filament de protonéma croît, entouré d'un très mince film d'eau.

Quelle que soit alors la technique utilisée :

— application de substances diverses sous la forme d'un petit bloc d'agar au niveau des axes;

— technique des deux milieux, séparés par une discontinuité, utilisée par LARPENT chez les champignons;

la diffusion dans le film est telle, que la substance agit aussi bien à l'avant qu'à l'arrière du point d'application.

Des manipulations réalisées avec du phosphore radio-actif, selon la technique de BRANDES (1967) (culture sur anneaux de gélose) et autoradiographie, n'ont pas donné de meilleurs résultats : la cellophane permettant une diffusion du P^{32} .

Il nous a donc été impossible de mettre en évidence des phénomènes de transport à l'intérieur du protonéma de Bryales. L'observation fréquente de phénomènes d'autolyse nous en laisse cependant présumer l'existence. A l'obscurité, sur milieu carencé, les cellules situées à l'arrière des filaments se vident, au profit semble-t-il des cellules de l'avant, pour ne laisser subsister que des fantômes constitués par les membranes qui restent en place. Il est vraisemblable que le transport se fait à l'intérieur du filament pluricellulaire et non par l'intermédiaire d'une diffusion des produits de la lyse dans le milieu, suivie d'une réabsorption par les cellules apicales en croissance.

En résumé, le protonéma des Bryales et le mycélium de champignons sont comparables morphologiquement, et sont le siège de corrélations d'inhibition par concurrences trophiques.

Cependant, dans le protonéma, les phénomènes de diffusion rendent actuellement impossible toute démonstration de l'existence de carence par concurrence entre les apex en croissance. Toutefois, contrairement

à ce que LARPENT a observé chez les champignons, il n'existe pas chez les Bryales de ramifications s'allongeant à une vitesse inférieure à celle des axes principaux : ou bien les rameaux latéraux se développent à une vitesse comparable ou bien ils arrêtent très tôt leur croissance.

Mais, par d'autres côtés, les Bryales sont plus proches des végétaux supérieurs que les champignons. On est en effet en mesure d'y soupçonner l'existence de substances morphogènes agissant au niveau de la ramification et du bourgeonnement, alors qu'elles n'existent pas à ce stade du cycle de développement chez les champignons.

CARACTÈRES MORPHOLOGIQUES ET PHYSIOLOGIQUES DE LA RAMIFICATION CHEZ LES BRYALES

A. — *Aspects morphologiques.*

1° **Caractères particuliers de la cellule apicale.** — La croissance en longueur d'un filament protonématique est la conséquence de la division de la cellule apicale seule. C'est par la calotte terminale de la cellule apicale que se réalise tout l'accroissement. Dans cette région extrême, le cytoplasme est granuleux, mais ne contient pas de plastes. Un peu au-dessous il en contient un ou deux, et encore un peu plus en arrière vient l'amas apical renfermant la majorité des plastes. De plus, dans la cellule apicale, le noyau est rond avec un gros nucléole vacuolaire. Dans les cellules suivantes, les vacuoles du nucléole disparaissent, le noyau prend une forme ovale puis s'allonge jusqu'à devenir fusiforme, tandis que le nucléole perd de sa netteté (BOPP, 1954, 1955).

A son extrémité, la membrane est sans cesse mince et en évolution, ce qui lui permet de diriger et d'assurer la croissance de l'ensemble du filament.

Quand elle se divise perpendiculairement à son grand axe, les deux cellules-filles sont différentes. Cette inégalité est génératrice de différenciation qui consiste ici :

a) *Pour la cellule apicale* : en un rythme de division rapide. En effet, une cellule terminale se redivise immédiatement après avoir achevé son élongation. Une cellule subapicale n'acquiert cette possibilité que lorsqu'elle est séparée par deux ou trois cellules de la cellule terminale;

— par le fait qu'elle possède seule le gradient de la croissance filamenteuse;

— en l'impossibilité de se diviser obliquement pour engendrer une ramification, comme nous l'avons souligné précédemment.

b) *Pour la cellule subapicale* : en une inaptitude à la croissance intercalaire; en la possibilité de donner naissance à une ébauche

latérale dès qu'elle est suffisamment éloignée de la cellule terminale. Il faut donc reconnaître un pouvoir inhibiteur à la cellule apicale sur les cellules sous-jacentes. En effet, si on isole ces dernières, elles sont alors capables de régénérer latéralement. On ne peut cependant exclure l'effet de blessure dans de telles expériences. Ces phénomènes d'inhibition sont à rapprocher de ceux observés entre méristème apical et méristémoïdes (BÜNNING, 1952) : des inhibitions corrélatives existeraient entre les lieux de grande activité métabolique (synthèse cytoplasmique active). De même, chez les algues, il est possible de mettre en évidence de tels phénomènes : une cellule isolée engendre deux ou trois axes chlorophylliens; au contraire, une bouture pluricellulaire donne seulement naissance à un axe chlorophyllien au pôle apical et à un rhizoïde au pôle basal (LARPENT, 1968).

La ramification peut donc être considérée comme une différenciation cellulaire résultant de division cellulaire inégale, ce qui est une généralisation nouvelle de la loi de Bünning.

2° Ramification du protonéma et croissance bidimensionnelle du prothalle de Fougères. — Dans le prothalle de Ptéridophytes, MILLER (1968), à la suite de SOBOTA et PARTANEN (1966, 1967), pense que les facteurs qui permettent le passage de la croissance unidimensionnelle à la croissance bidimensionnelle agissent indirectement en modifiant l'équilibre entre l'élongation cellulaire et le taux des divisions cellulaires.

L'initiation de la ramification du protonéma de Bryales, c'est-à-dire de la croissance bidimensionnelle du prothalle de Ptéridophytes, ne peut pas être simple, puisqu'il s'agit de déterminer les facteurs qui président au contrôle de la division cellulaire et de l'élongation. Pourtant l'analogie entre ces deux phénomènes est frappante, et on est en droit de préciser les rapports qui peuvent exister entre eux sur le plan physiologique.

B. — *Aspects physiologiques : rôle des acides ribonucléiques.*

De nombreuses expériences ont été faites par RAGHAVAN (1964, 1965 *a*, 1965 *b*), RAGHAVAN et TUNG (1967), HOTTA (1960), HOTTA et OSAWA (1958) sur le prothalle de Fougères. Tous ces essais cherchaient à préciser le rôle des protéines et des acides nucléiques dans la morphogenèse du prothalle de Fougères, en utilisant des inhibiteurs variés et spécifiques des différentes synthèses.

Aussi, RAGHAVAN et TUNG (1967) inhibent la croissance bidimensionnelle du prothalle d'*Asplenium nidus* par l'addition de chloramphénicol (30 à 90 $\mu\text{g/ml}$) et de puromycine (400-500 $\mu\text{g/ml}$), concentrations qui n'affectent que faiblement la germination et la croissance filamenteuse. Des réponses identiques avaient déjà été obtenues avec l'actinomycine-D.

DAVIS (1968) arrive à la conclusion suivante : pour lui, le mécanisme responsable du passage à la croissance dans la deuxième dimension de l'espace serait plus sensible aux inhibiteurs des acides ribonucléiques et à ceux de la synthèse protéique que le mécanisme de la division cellulaire lui-même. Cette conclusion est un argument en faveur de l'hypothèse de MOHR et HOLL (1964), OLHENROTH et MOHR (1964), qui pensent que l'orientation du fuseau mitotique est sous contrôle génétique.

Des expériences similaires réalisées sur le protonéma nous ont permis de retrouver très clairement ce rôle particulier des acides ribonucléiques dans la ramification du protonéma; nous observons une inhibition de cette dernière en présence d'inhibiteurs comme la 8-azaguanine, l'actinomycine et la ribonucléase, et, dans le premier cas, la guanine lève l'inhibition.

Nous comprenons même mieux pourquoi sur les fougères ce sont des acides ribonucléiques qui interviennent : en effet, le premier stade de la ramification est une modification locale de la membrane et sans doute du cytoplasme, puisqu'il y a reprise de la synthèse de ce dernier avant que le noyau migre puis se divise (BOPP, 1966, film). Il est donc logique que l'ADN nucléaire, qui dirige certainement cette évolution, le fasse à distance par des messagers spéciaux qui déclencheraient les premières modifications morphologiques, qu'une étude au microscope électronique nous permettrait peut-être de mieux connaître.

Il ne faudrait pas croire cependant que cette conception, si elle jouit d'une large audience, soit unanimement acceptée; MILLER (1968) considère en effet que l'inhibition de la croissance bidimensionnelle observée par RAGHAVAN (1965 *a*), NAKAZAWA (1960), HOTTA et OSAWA (1958), KATO (1964), n'est pas spécifique, mais qu'elle résulte simplement d'une inhibition générale de la croissance. Pour MILLER, si l'on veut parler d'inhibition spécifique de la croissance bidimensionnelle, il est nécessaire de montrer que les plantes traitées sont capables de se développer sous forme de filaments, dont le nombre de cellules est supérieur à celui compté sur les filaments témoins, au moment où ceux-ci amorcent leur croissance dans la deuxième dimension. Si un inhibiteur retarde ou limite la croissance, de sorte qu'en fin d'expérience les plantes traitées n'ont pas pu atteindre le stade morphologique à partir duquel elles initieraient normalement la croissance dans la deuxième dimension, l'inhibiteur ne peut alors pas être considéré comme spécifique.

Cette critique ne nous semble pas s'appliquer à nos expériences : sur un protonéma de Bryales, un inhibiteur est spécifique s'il inhibe les mitoses obliques responsables de la ramification, sans modifier le rythme des mitoses perpendiculaires responsables de l'allongement.

La 8-azaguanine, la D-actinomycine et la ribonucléase répondent à ce critère; sont exclus le chloramphénicol et la 5-FUDR. Les acides ribonucléiques sont donc bien responsables de la ramification. Comme

en témoigne RAGHAVAN (1968), on est amené à penser qu'une partie seulement d'entre eux participent à ce phénomène, les autres assurant la croissance en longueur. S'agit-il d'acides ribonucléiques nouvellement synthétisés ? C'est une question qu'il faudra tenter de préciser ultérieurement.

Le rôle important des acides ribonucléiques dans la ramification peut être associé à celui d'éventuelles substances hormonales. Une synthèse d'ARN serait indispensable pour que la naissance d'une ramification induite par ces substances morphogènes puisse avoir lieu. Il sera donc intéressant d'étudier l'évolution des acides nucléiques et des protéines sur un matériel, et c'est le cas du nôtre, où l'on contrôle parfaitement la ramification.

Rappelons enfin que la connaissance du déterminisme de la ramification est une étape vers la compréhension du mécanisme expliquant la caulogenèse, puisqu'un rameau court est la base indispensable à l'édification d'un bourgeon.

RAMIFICATION ET CAULOGENÈSE

Le bourgeonnement représente l'étape la plus spectaculaire dans le développement du gamétophyte de Bryales. La croissance filamenteuse du protonéma précède la naissance de la plante feuillée. Cette transformation morphologique est basée avant tout sur un changement d'orientation des divisions cellulaires, changement qui a lieu dans certaines cellules particulières, et qui conduit à la croissance dans la troisième dimension de l'espace. On retrouve là le rôle important des phénomènes de polarité cellulaire, qui se traduit par des relations directes entre le rapport de la longueur au diamètre des cellules et le taux de divisions, comme nous l'avons déjà vu précédemment pour la ramification. Le rapport L/l entre la longueur et la largeur d'une cellule en permet en effet une expression quantitative. Plus il sera faible, plus la cellule sera isodiamétrique et plus élevé sera le taux de multiplication cellulaire favorisant la nouvelle organogenèse.

Cette morphogenèse est sous la dépendance de facteurs génétiques, comme l'a montré OELHKERS (1965). Les mutants obtenus sont incapables de former des bourgeons, seule existe une croissance filamenteuse. Une caulogenèse normale est rétablie dans certains cas par l'apport de glucose ou par un traitement à l'acide β -indolylacétique (HATANAKA-ERNST, 1966). On est donc amené à conclure que des processus métaboliques divers sont nécessaires à la mise en place des bourgeons.

L'action de la kinétine sur le bourgeonnement, dans les cultures à la lumière, est spécialement bien connue (BOPP, 1968), et ceci dans de nombreuses espèces de mousses (BRANDES, 1968). De plus, une série de facteurs influencent indirectement la formation des bourgeons en

agissant sur la différenciation du protonéma lui-même au cours du passage du stade chloronéma au stade caulonéma indispensable à l'initiation des ébauches caulinaires. Ainsi, KLEIN (1967) a extrait, à partir d'une suspension (100 ml) de milieu de culture où avaient séjourné, pendant 24 heures, 25 protonémas âgés de 18 jours, une substance, stable à 100° C, soluble dans l'eau et dans l'alcool et qu'il a surnommée le facteur H. Ajouté à une culture de 6 jours, il permet aux bourgeons d'apparaître le quatorzième jour, alors qu'ils ne sont reconnaissables que le vingtième sur les témoins. Cette substance peut être considérée comme une hormone responsable de la formation des bourgeons sur le caulonéma. La nature des cellules qui la synthétisent dans un protonéma n'est pas connue, ni le mode de transport à l'intérieur des filaments. Est-ce par des phénomènes de diffusion, comme dans le cas de gamones de phycomycètes ? Les nombreuses expériences de BOPP et STEHLE (1957), BRANDES (1967), n'ont pu résoudre le problème.

De plus, pour JAHN (1964) la kinétine pénètre dans les cellules du protonéma au cours de sa croissance, mais ne subit aucune translocation. BOPP et DIEKMANN (1967) ont montré que l'action de la kinétine n'est possible que si ces cellules ont atteint ce stade caulonéma.

Les conditions indispensables au bourgeonnement correspondent donc à une différenciation assez profonde des cellules. SZWEYKOWSKA et HANDSZU (1965), BRANDES (1967) ont montré que la kinétine est beaucoup plus un facteur de division et d'élargissement cellulaires qu'une substance stimulant la synthèse des protéines.

BOPP et DIEKMANN (1967), BRANDES (1967), BRANDES et BOPP (1965), par l'action de la D-actinomycine, démontrent le rôle indispensable de la synthèse des acides nucléiques dans la caulogenèse.

Les facteurs endogènes contrôlant la morphogenèse du protonéma et la caulogenèse semblent donc très importants dans le développement des mousses à la lumière.

Peut-on appliquer ce même schéma aux cultures qui, comme beaucoup des nôtres, sont réalisées à l'obscurité ? S'il existe des analogies, il y a cependant des différences que nous allons nous efforcer de dégager grâce à nos observations.

1° D'après BOPP (1965), la différenciation du chloronéma en caulonéma serait impossible à l'obscurité. Nos expériences ne sont pas en accord avec cette idée : un protonéma de *Ceratodon* ne forme jamais de bourgeons avant d'avoir atteint une certaine « maturité de bourgeonnement » correspondant à 9 jours de culture au minimum. L'induction du bourgeonnement provoqué par la kinétine et l'AIA demandant 5 jours, il s'ensuit qu'un protonéma développé à l'obscurité, ne pourra pas donner de bourgeons avant d'avoir atteint l'âge de 14 jours.

Une différenciation du protonéma à l'obscurité, analogue à un caulonéma, n'est donc pas à exclure. De plus, le chloronéma cultivé à l'obscurité présente des membranes obliques et des leucoplastes allongés en fuseau, précisément à partir du neuvième jour de culture.

Or, ces caractères sont typiquement ceux observés sur un caulonéma pour des cultures faites à la lumière. Une étude cytologique plus approfondie serait donc nécessaire pour confirmer l'existence probable d'un stade caulonéma à l'obscurité.

2° Comme à la lumière, la kinétine est indispensable au déclenchement de la caulogenèse, mais elle doit être associée à l'auxine. Ceci n'est pas en contradiction avec les résultats de JAHN (1964) qui obtient des bourgeons à la lumière, par application de kinétine seule. Le métabolisme cellulaire, à la lumière, est tel qu'il permet aux cellules de synthétiser l'auxine.

Il serait d'un grand intérêt de comparer, à l'obscurité, l'action du facteur H de Klein à celle de l'auxine d'une part, et de la kinétine d'autre part.

Comparativement aux résultats de KLEIN (1967) qui montre que l'inhibition de croissance du caulonéma n'est en aucun cas en relation avec la formation de bourgeons, nous avons montré qu'à l'obscurité le traitement du protonéma par le mélange auxine-kinétine ne modifie en rien la vitesse de croissance des filaments. Si l'inhibition de croissance est sans relation avec la caulogenèse, l'utilisation d'inhibiteurs variés de l'allongement du protonéma ne devrait pas modifier le temps nécessaire à la formation des bourgeons. De telles expériences seraient intéressantes à entreprendre et permettraient de discuter, sur de nouvelles bases, le point de vue de l'Ecole allemande (BOPP, 1961) face à l'hypothèse de GORTON et EAKIN (1957), SZWEYKOWSKA (1966).

BOPP, en effet, critique le schéma de GORTON et EAKIN, précisant qu'il n'a jamais pu observer, lors du développement d'un bourgeon, le stade pro-bourgeon à deux cellules et le stade morula précédant la formation de la cellule apicale. Pour GORTON et EAKIN et SZWEYKOWSKA, ces stades sont si rapides qu'ils peuvent passer inaperçus. BOPP propose le schéma suivant de la caulogenèse : une cellule quelconque du caulonéma serait induite par des facteurs morphogénétiques tels que la lumière rouge ou des substances de croissance (auxine, gibbérelline, kinétine), auxquels s'ajouterait un système autoreplicatif, stabilisant la différenciation de la cellule en cellule apicale de tige. Ce système serait constitué de protéines et d'acides ribonucléiques. Des résultats de GORTON et EAKIN (1957), mettant en évidence le rôle prépondérant du mélange adénine + uracile par rapport à celui de l'adénine + thymine, sont en faveur de cette hypothèse. La kinétine, connue comme stimulateur du bourgeonnement, agirait en association avec le système autoreplicatif qui serait donc composé de ribonucléoprotéines.

L'hypothèse de BOPP semble d'un grand intérêt. Néanmoins, comme le souligne SZWEYKOWSKA, elle ne tient pas compte de l'orientation du plan des divisions cellulaires et des facteurs qui l'affectent, facteurs qui semblent être d'une importance capitale dans la morphogenèse. Dans l'état actuel de nos connaissances, nos expériences appor-

tent des arguments aux deux hypothèses, sans permettre de faire un choix mettant en évidence à la fois l'importance du changement d'orientation des plans de divisions cellulaires d'une part, et des acides ribonucléiques d'autre part.

3° Comme à la lumière, le bourgeonnement à l'obscurité est supprimé par les inhibiteurs des acides ribonucléiques comme l'actinomycine-D. Le bourgeonnement est donc bien sous contrôle génétique. Selon BECKER (1964), la kinétine permettrait l'activation de gènes qui contrôlèrent alors la caulogénèse.

L'actinomycine inhibe aussi bien la croissance dans la deuxième dimension (donc la ramification) que celle dans la troisième dimension (le bourgeonnement). Les facteurs présidant au changement d'orientation du plan des divisions cellulaires semblent donc être de même nature et deux types de messages au moins se succèdent dans le temps. Dans les deux cas, sont confondues et étroitement associées l'action des acides nucléiques et celle des substances morphogènes : auxine, cytokinine dans le cas plus précisément du bourgeonnement. Il resterait à démontrer de quelle nature est leur collaboration. Est-elle semblable à celle des acides ribonucléiques messagers sensibles à l'actinomycine et essentiels pour que l'auxine agisse comme inducteur de la croissance (NOODEN et THIMANN, 1963; KEY et SHANNON, 1964) chez les végétaux supérieurs ? Ces travaux peuvent servir de point de départ à de nouvelles expériences dans ce domaine, en relation avec celles conduites chez les Ptéridophytes par RAGHAVAN (1968).

Une telle recherche pourrait se faire en utilisant, par exemple, les mutants dépourvus de pouvoir caulogène connus chez la Funaire et décrits par OEHLKERS (1965), BAUER (1966 *a*, 1966 *b*), et que nous avons déjà mentionnés à plusieurs reprises. Des essais préalables seraient nécessaires pour préciser la situation exacte du gène muté sur le chromosome. L'utilisation de précurseurs de synthèses nucléiques et de substances hormonales permettrait de préciser les relations entre gènes et morphogénèse. Des essais similaires ont déjà été réalisés chez les champignons, en particulier chez le *Podospora anserina* (N'GUYEN VAN HUONG, 1967). La mutation d'un gène conduit à la croissance sympodiale du thalle et à l'apparition de vagues de ramification successives. De même, BRODY et TATUM (1967) étudient, chez certains mutants de *Neurospora*, les modifications morphologiques induites par la mutation d'un seul gène, responsable de la synthèse d'un enzyme indispensable à la construction de la membrane.

Les Bryales fournissent un excellent matériel pour l'étude des processus de différenciation, allant de la germination de la spore jusqu'à la naissance de la plante feuillée, en passant par le stade de croissance filamenteuse. La simplicité de leur organisation permet d'envisager, à l'échelle cellulaire, des problèmes qui se posent chez les plantes supérieures à l'échelle des tissus ou des organes dont on ignore encore, trop souvent, s'ils sont passibles des mêmes solutions.

Résumé.

Les corrélations d'inhibition ont été étudiées au cours du développement du chloronéma de quelques Bryales (*Funaria hygrometrica*, *Ceratodon purpureus*, *Leptobryum pyriforme*).

1° L'étude du matériel expérimental a permis de démontrer que le protonéma issu d'une spore est identique à celui issu de boutures uni ou pluricellulaires.

2° Chez la *Funaire* et le *Ceratodon*, une dominance apicale, répondant aux critères définis chez les végétaux supérieurs et les champignons, existe dans le protonéma cultivé à l'obscurité.

Comme chez les champignons, il est possible de mesurer quantitativement la dominance apicale par une proportion déterminée d'ébauches avortées.

3° Cependant, certaines particularités caractérisent les Bryales :

— si un protonéma est cultivé à la lumière, toutes les ramifications se développent à une vitesse comparable à celle de l'axe qui les porte;

— à l'obscurité, les ébauches peuvent avoir deux comportements bien différents : soit un avortement rapide, soit une croissance qui se maintient identique à celle de l'axe. Dans le premier cas, les ébauches ne contiennent que rarement un noyau. Aucun intermédiaire n'est possible, contrairement à ce qui a été observé chez les champignons.

4° Des corrélations d'inhibition ont pu être mises en évidence, tant à l'échelle cellulaire qu'à celle du filament, à l'aide d'expériences de microchirurgie :

— corrélations d'inhibition *intracellulaires* : sur un protonéma intact, les cellules apicales se divisent uniquement dans le plan perpendiculaire à leur axe de symétrie; elles ne portent jamais de ramification. Isolées, elles acquièrent parfois cette potentialité, mais l'ébauche formée est le plus loin possible de l'apex (pôle distal).

— corrélations d'inhibition *intercellulaires* : une cellule intercalaire isolée régénère deux filaments, six cellules intercalaires régénèrent seulement sept filaments au lieu de douze. Une concurrence s'établit donc entre les cellules.

— corrélations d'inhibition de croissance entre axe et ramifications, sur des protonémas en culture à l'obscurité. Ainsi pour le *Ceratodon purpureus*, l'absence de lumière conduit :

— soit à une dominance apicale totale si le milieu est dépourvu de glucose;

— soit à une dominance apicale résiduelle, si le milieu renferme du glucose, qui, comme chez les champignons, est mesurable par un pourcentage de rameaux inhibés.

5° La naissance des ramifications est étroitement liée à l'action de la lumière :

— un faible éclaircissement diminue à la fois le nombre d'ébauches latérales et le pourcentage de rameaux en croissance;

— l'optimum de lumière pour la ramification (mitoses obliques)

est différent de celui nécessaire pour la croissance en longueur (mitoses perpendiculaires) des filaments principaux;

— la ramification est entièrement contrôlée par un système photosynthétique. L'intervention du système phytochrome n'a pu être décelée. S'il existe des substances morphogènes, leur apparition doit être liée à la photosynthèse.

6° L'action de la lumière sur la morphogenèse du protonéma ne peut être remplacée que partiellement par le glucose pour le *Ceratodon purpureus*, et par l'acide traumatique pour la *Funaire*, cultivés à l'obscurité.

— Comme la lumière, le sucre et l'acide traumatique inhibent la vitesse d'allongement des filaments protonématiques. Cette diminution est due à un rythme plus faible des mitoses perpendiculaires et un allongement plus faible des cellules.

— La traumatine et le glucose, comme la lumière, stimulent les mitoses obliques responsables de la ramification.

— Si l'acide traumatique et le glucose, comme la lumière, provoquent la naissance des ébauches latérales, à la différence de celle-ci, ils ne permettent pas leur croissance généralisée. Une dominance apicale partielle subsiste, se traduisant par un certain pourcentage de rameaux inhibés.

Comme chez les champignons et les plantes supérieures, il est donc nécessaire de distinguer entre les deux phénomènes : naissance et croissance des ramifications.

7° L'utilisation d'inhibiteurs, comme la 8-azaguanine, la D-actinomyicine et la ribonucléase, a permis de montrer l'action spécifique des acides ribonucléiques dans la ramification. Des analogies étroites sont mises en évidence entre la ramification du protonéma (mitoses obliques) et la croissance bidimensionnelle du prothalle de fougères.

8° La ramification du protonéma est une étape indispensable à la caulogenèse comme en témoignent les résultats obtenus sur des cultures développées entièrement à l'obscurité.

Par addition d'un mélange d'auxine et de kinétine, il est possible d'induire à volonté la formation des bourgeons, à condition toutefois que les axes protonématiques soient ramifiés, grâce à l'apport de glucose (*Ceratodon*) ou d'acide traumatique (*Funaire*).

La mise en place des bourgeons, sur le protonéma, se fait en deux étapes à caractères physiologiques différents : une « maturité » de bourgeonnement (x) doit d'abord être atteinte par le protonéma, puis dans un deuxième temps se place l'induction (y) au bourgeonnement proprement dit.

L'âge physiologique minimum d'un protonéma nécessaire à la caulogenèse est égal au temps de maturité d'induction (x) augmenté du temps d'induction (y), soit 14 jours au total.

Nos recherches montrent que, malgré quelques points de divergence que nous nous sommes efforcée de mettre en relief, les grandes étapes de la caulogenèse sont identiques à la lumière et à l'obscurité.

BIBLIOGRAPHIE

- AINSWORTH (W.), 1956. — Axillary shoots of the stolons of *Mnium cuspidatum*. *Bryologist.*, **59**, p. 187-191.
- ALLSOPP (A.) et MITRA (G. C.), 1956. — The heterotrichous habit in the protonema of the Bryales. *Nature*, **178**, n° 4541, p. 1063-1064.
- ANDEL (O. M. VAN), 1952. — Germination of the spores and development of primary and secondary protonema of *Funaria hygrometrica*. *Trans. Brit. bryol. Soc.*, **2**, p. 74-81.
- BAKER (D. B.) et RAY (P. M.), 1965. — Relation between effects of auxin on cell wall synthesis and cell elongation. *Plant. Physiol. (U.S.A.)*, **40**, n° 2, p. 360-368.
- BAUER (L.), 1942. — Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. *Flora (Jena)*, **38**, p. 30-84. — 1966 a. Isolierung und Testung einer kinetinartigen Substanz aus Kalluszellen von Laubmoosporophyten. *Z. Pflanzenphysiol. Dtsch.*, **54**, n° 4, p. 241-253. — 1966 b. Ueber ein Kinin aus Kalluszellen von Laubmoosen und sein Rolle bei der Morphogenese. *Ber. Deut. Botan. Ges.*, **79**, p. 207.
- BELAN (A.), 1966. — Croissance et ramification du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) cultivé à la lumière ou à l'obscurité. *Diplôme d'études supérieures, Laboratoire de Physiologie végétale, Clermont-Ferrand*.
- BELKENGREN (R. O.), 1962. — Growth and sexual reproduction of the moss *Amblystegium riparium* under sterile conditions. *Amer. Journ. Bot.*, **49** (6), p. 567-571.
- BELL (P. R.) et ZAFAR (A. H.), 1961. — Changes in the level of the protein nitrogen during growth of the gametophyte and the initiation of the sporophyte of *Dryopteris borreii* (Newm.). *Ann. Bot. N. S.*, **23**, p. 531-546.
- BENECKE (W.), 1903. — Ueber die Keimung der Brutknospen von *Lunularia cruciata* mit vergleichenden Ausblicken auf andere Pflanzen. *Bot. Ztg.*, **61**, p. 19-46.
- BERGFELD (R.), 1965. — Zellteilung und Morphogenese der Vorkeime von *Dryopteris filix mas* (L.). Schott in hellroter und blauer Strahlung bei Hemmung der Proteinsynthese. *Z. Naturforsch.*, **20** b, p. 591-594.
- BERTHIER (J.), 1961. — Inhibition des bourgeons chez *Mnium undulatum*. Intérêt expérimental de quelques Eubryales Acrocarpes. *Bull. Soc. Fr. Physiol. Végét.*, **7**, n° 2, p. 95. — 1965. Influence du milieu sur la ramification du *Fontinalis antipyretica* L. *C. R. Acad. Sci.*, **260**, p. 4046-4049.
- BOPP (M.), 1952. — Entwicklungsgeschichte und physiologische Untersuchungen an Laubmoosprotonemen. *Z. f. Bot.*, **40**, p. 119-152. — 1953. Die Wirkung von Heteroauxin auf Protonemawachstum und Knospenbildung von *Funaria hygrometrica*. *Z. Bot.*, **41**, p. 1-16. — 1954. Ein Beitrag zur Differenzierung im Moosprotonema. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **67**, p. 177-184. — 1955. Die Entwicklung von Zelle und Kern im Protonema von *Funaria hygrometrica* Sibth. *Planta*, **45**, p. 573-590. — 1961. Morphogenese der Laubmoose. *Biol. Rev.*, **36**, p. 237-280. — 1963. Development of the protonema and bud formation in mosses. *J. Linnean Soc. London Bot.*, **58**, (373), p. 305-309. — 1965 a. Entwicklungsphysiologie der Moose. *Handb. d. Pflanzenphysiologie*, Bd. **XV**, 1, p. 802-843. — 1965 b. Die Morphogenese der Laubmoose als Beispiel eines morphogenetischen Systems. *Ber. Dtsch. Bot. Gesellsch.*, **78**, n° 11, p. 44-54. — 1968. Control of differentiation in Fern Allies and Bryophytes. *Ann. Rev. Plant. Physiology*, **19**, p. 361-380.
- BOPP (M.) et BRANDES (H.), 1964 a. — Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. II. Ueber den Zusammenhang zwischen Protonemadifferenzierung und Kinetinwirkung bei der Bildung von Moosknospen. *Planta*, **62**, p. 116-136. — 1964 b. Analysis of protonema development of mosses. II. On the relationship between protonema differentiation and kinetin action on the formation of moss buds. *Planta*, **62** (2), p. 116-136.

- BOPP (M.), JAHN (H.) et KLEIN (B.), 1964. — Eine einfache Methode, das Substrat während der Entwicklung von Moosprotonemen zu wechseln. *Rev. Bryol. Lichen*, **33**, n° 1-2, p. 219-223.
- BOPP (M.) et KLEIN (B.), 1966. — Experiments on the analysis of protonema development of mosses. I. Endogenous growth regulators in the protonema of *Funaria hygrometrica*. *Port. Acta. Biol. Ser. a. Morfol. Fisiol. Genet. Biol. Geral.*, **7**, n° 1-4, p. 95-110.
- BOSSELER (F.), SIX (N.) et SIMIC (D.), 1964. — Effets *in vivo* de la ribonucléase et de la puromycine sur l'incorporation de divers acides aminés dans les protéines de racines d'*Allium cepa*. *Bull. Acad. Roy. Belg.*, p. 1183-1194.
- BRACHET (J.), 1954. — Effects of ribonuclease on the metabolism of living root-tip cells. *Nature*, **174**, p. 876-877. — 1955. Action of ribonuclease and ribonucleic acid on living amoeba. *Nature*, **175**, p. 851-853. — 1956. The mode of action of ribonuclease on living root tips. *Biochim. Biophys. Acta*, **19**, p. 583.
- BRACHET (J.) et SIX (N.), 1959. — New observations on the mode of action of ribonuclease on living root-tips. *Biochim. Biophys. Acta*, **35**, p. 580-581.
- BRANDES (H.), 1967. — Der Wirkungsmechanismus des Kinetins bei der Induktion von Knospen am Protonema der Laubmoose. *Planta*, **75**, p. 55-71. — 1968. Die Wirkung von kinetin auf die Protonemaentwicklung verschiedener Laubmoosarten. *Rev. Bryol. Lichen*, **35** (1-4), p. 158-164.
- BRANDES (H.) et BOPP (M.), 1965. — Spezifische Hemmung der Kinetinwirkung durch Actinomycin D. *Naturwiss*, **52**, p. 521.
- BRANDES (H.) et KENDE (H.), 1968. — Studies on cytokinin controlled bud formation in moss protonema. *Plant. Physiol.*, **43**, n° 5, p. 827-838.
- BRIERS (M.), THOMAS (Y.) et BRACHET (J.), 1957. — Action de la ribonucléase sur l'amylase, la protéase et la dipeptidase des amibes. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.*, **65**, p. 157-158.
- BUCH (H.), 1920. — Physiologische und experimentell-morphologische Studien an beblätterten Lebermoosen. I, II. *Finska Vetensk. Soc. Förhandl. A.*, **62**, n° 6.
- BULLER (A. H. R.), 1933. — *Researches on Fungi*, vol. **5**. Longmans Green and Co, 416 p.
- BÜNNING (E.), 1956. — General processes of differentiation. In : *The Growth of leaves*. Hrsg. F. L. Milthorpe.
- BÜNNING (E.) et WETTSTEIN (D. V.), 1953. — Polarität und Differenzierung an Mooskeimen. *Naturwiss.*, **40**, p. 147-148.
- CAMPBELL (D. H.), 1928. — *The structure and development of mosses and ferns (Archegoniata)*. 4th edn., New York : Mac Millan, 708 p.
- CHAMPAGNAT (P.), 1965. — Physiologie de la croissance et de l'inhibition des bourgeons : dominance apicale et phénomènes analogues. *Handb. d. Pflanzenphysiologie*, Bd. **XV**, 1, p. 1106-1164.
- CHANTRENNE (H.) et DEVREUX (S.), 1960. — Action de la 8-azaguanine sur la synthèse des protéines et des acides nucléiques chez *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, p. 486-499.
- CREASER (E. H.), 1956. — The assimilation of amino acids by bacteria. 22. The effect of 8-azaguanine upon enzyme formation in *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Journ.*, **64**, p. 539-545.
- DARLING (W. M.) et ARDLE (Mc. M.), 1959. — Effect of inoculum dilution on spore germination and sporeling growth in a mutant strain of *Aspergillus amstelodami*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, **42**, p. 235-242.
- DAVIS (B. D.), 1968. — The transition from filamentous to two-dimensional growth in Fern gametophytes. I. The requirement for protein synthesis in gametophytes of *Pteridium aquilinum*. *Amer. J. Bot.*, **55** (5), p. 532-540.
- ENGLISH (J.), BONNER (Jr. J.) et HAAGEN SMIT (A. J.), 1939 a. — The wound hormones of plants. II. The isolation of a crystalline active substance. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S.*, **25**, p. 323-329. — 1939 b. The wound hormones of plants. IV. Structure and synthesis of a traumatin. *J. Amer. Chem. Soc.*, **61**, p. 3434-3436.

- FÈVRE (M.), 1967. — Action de la D-actinomycine et de la puromycine sur la croissance et la ramification du mycelium jeune de *Saprolegnia monoïca* Pringsheim. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, p. 293-295.
- FITTING (H.), 1949. — Ueber die Umkehrung der Polarität in den Sporenkeimlingen einiger Laubmoose. *Planta*, **37**, p. 635-696. — 1950. Ueber die Umkehrung der Polarität in den Sporenkeimlingen einiger Laubmoose. *Planta*, **37**, p. 635-675.
- FRIES (N.), 1945. — Some experiments with mosses cultured in the darks. *Bot. Notis. Lund.*, p. 417-424.
- FRICTSCH (F. E.), 1935. — *The structure and reproduction of the Algae*, 1, Cambridge.
- GAUSE (E.), 1931. — Die Entwicklung einiger Laubmoosvorkeime. *Thèse, Marburg*.
- GILES (K. L.) et MALTZAHN (K. E.), 1967. — Interaction of Red, Far-Red and Blue light in cellular regeneration of leaves of *Mnium affine*. *The Bryologist*, **70**, n° 3, p. 312-315.
- GOEBEL (K.), 1896. — Ueber Jugendformen von Pflanzen und deren künstliche Wiederhervorrufung. *Bay. Akad. Wiss. Math. Phys. Kl.*, **26**, p. 447-497. — 1898 Archegoniatenstudien. VIII. Rückschlags bildung und Sprossung bei *Metzgeria*. *Flora (Jena)*, **85**, p. 69-74. — 1908. *Einleitung in die experimentelle Morphologie der Pflanzen*. Leipzig, Teubner.
- GOLDBERG (I. H.) et RABINOWITZ (M.), 1962. — Actinomycin-D inhibition of deoxyribonucleic acid-dependent synthesis of ribonucleic acid. *Science*, **136**, p. 315-316.
- GOLDBERG (I. H.) et REICH (E.), 1962. — Basis of actinomycin action. I. DNA binding and inhibition of RNA-polymerase synthetic reactions by actinomycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **48**, p. 2094-2101. — 1964. Actinomycin inhibition of RNA synthesis directed by DNA. *Fed. Proc.*, **23**, p. 958-964.
- GORTON (B. S.) et EAKIN (R. E.), 1957. — Development of the gametophyte in the moss *Tortella caespitosa*. *Bot. Gaz.*, **119**, p. 31-38.
- GORTON (B. S.), SKINNER (C. S.) et EAKIN (R. E.), 1957. — Activity of some 6-(substitued)-purines on the development of the moss *Tortella caespitosa*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **66**, p. 493-496.
- GOURGAUD (M.), 1965 a. — La notion de dominance apicale chez le protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.). *C. R. Acad. Sc.*, **260**, p. 1721-1724. — 1965 b. Acide traumatique et ramification à l'obscurité du protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.) cultivé *in vitro*. *C. R. Acad. Sc.*, **261**, p. 2939-2941. — 1965 c. Formation de bourgeons sur le protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.) cultivé à l'obscurité. *C. R. Acad. Sc.*, **261**, p. 3185-3188. — 1966 a. Ramification et bourgeonnement à l'obscurité du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) cultivé *in vitro*. Colloque de morphologie expérimentale de Grenoble, *Bull. Soc. Bot. Fr.* (sous presse). — 1966 b. Variations de la croissance et de la dominance apicale en fonction de l'éclairement chez *Ceratodon purpureus* (Brid.). *C. R. Acad. Sc.*, **263**, p. 1220-1223. — 1966 c. Action comparée du sucre et de la lumière sur la croissance et la ramification du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Brid.). *C. R. des séances de la Soc. Biol.*, **157**, p. 2219-2222. — 1967 b. Action de la 8-azaguanine et de la guanine sur la croissance et la ramification du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) cultivé *in vitro* à l'obscurité. *C. R. Acad. Soc.*, **265**, p. 1381-1383.
- GOURGAUD (M.) et BELAN (A.), 1967. — Ramification et bourgeonnement à l'obscurité du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Hedw.) cultivé *in vitro*. *Bull. Soc. Bot. de Fr.*, p. 131-137.
- GOURGAUD (M.) et JACQUES (R.), 1967 a. — Croissance et ramification du protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.) cultivé en lumières monochromatiques. *C. R. Acad. Sc.*, **264**, p. 2196-2199.
- GOTTLIEB (D.) et SHAW (P. D.), 1967. — *Antibiotics*. Vol. I. Mechanism of Action. Springer Verlag, Berlin. Heidelberg, New York, 785 p.
- GREGORY (F. C.) et VEALE (S. A.), 1957. — A reassessment of the problem of apical dominance. *Symp. Soc. exp. Biol.*, **11**, p. 1-20.

- GUERN (J.) et HUGON (E.), 1966. — Remarques à propos du transport de la 6-benzyl-aminopurine marquée au ^{14}C dans les jeunes plantes étiolées de *Cicer arietinum* L. *C. R. Acad. Sc.*, **262**, p. 2226-2229.
- GURLITT (L.), 1918. — Ueber den Einfluss der Konzentration der Nährlösung auf einigen Pflanzen. *Beih. zum Bot. Centralbl.*, **35**, p. 279-341.
- HATANAKA-ERNST (M.), 1966. — Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an strahleninduzierten Protonemamutanten von *Funaria hygrometrica* (Sibth). *Z. Pflanzenphysiol.*, **55**, p. 259-277.
- HEITZ (E.), 1925. — Das Verhalten von Kern und Chloroplasten bei der Regeneration. *Z. f. Zellforsch. u. mikr. Anat.*, **2**, p. 69. — 1940. Die Polarität keimender Moossporen. *Verhandl. der Schweiz. Naturf. Ges.*, p. 168-170. — 1942. Die keimende *Funaria*spore als physiologisches Versuchsobjekt. *Der. Dtsch. Bot. Ges.*, **60**, p. 17-27.
- HOFFMAN (G. R.), 1964. — The effects of certain sugars on spore germination in *Funaria hygrometrica* (Hedw.). *The Bryologist*, **67**, n° 3, p. 321-329.
- HOLDHEIDE (W.), 1938. — Zur Physiologie und Soziologie von *Buxbaumia aphylla*. *Flora (Jena)*, **132**, p. 325-356.
- HOTTA (Y.), 1960. — The role of protein and ribonucleic acid in the differentiation of fern gametophyte. *Jap. J. Bot.*, **17**, p. 214-229.
- HOTTA (Y.) et OSAWA (S.), 1958. — Control of differentiation in the fern gametophyte by amino-acid analogs and 8-azaguanine. *Exp. Cell. Res.*, **15**, p. 85-94.
- HOTTA (Y.), OSAWA (S.) et SAKAKI (T.), 1959. — Ribonucleic acid and differentiation of the gametophyte of a polypodiaceous fern. *Develop. Biol.*, **1**, p. 65-78.
- HUGON (E.), 1967. — Observations sur la ramification et les corrélations d'inhibition entre bourgeons chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.). *Rev. Gen. Bot.*, **74**, p. 251-272.
- HURWITZ (J.), FURTH (J. J.), MALAMY (M.) et ALEXANDER (M.), 1962. — The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **48**, p. 1222-1230.
- ITO (M.), 1962. — Studies on the differentiation of fern gametophytes. I. Regeneration of single cells isolated from cordate gametophytes of *Pteris vittata*. *Bot. Mag.*, **75**, p. 19-27.
- IWASA (K.), 1965. — Chemical control of morphogenesis in moss protonema (*Funaria hygrometrica*). *Plant and Cell. Physiol.*, **6**, p. 421-429.
- JACQUES (R.), 1968. — Etude par spectrophotométrie *in vivo* de quelques propriétés nouvelles du phytochrome. *Physiol. Vég.*, **6** (2), p. 93-116.
- JACQUES (R.), CHABBAL (R.), CHOUARD (P.) et JACQUINOT (P.), 1964. — Mise au point d'un illuminateur spectral à usage biologique. *C. R. Acad. Sci.*, **259**, p. 1581-1584.
- JAHN (H. VON), 1964. — Der Einfluss von Kinetin auf die Anlage der Stämmchen von *Funaria hygrometrica* (Sibth). *Flora*, **154**, p. 568-588.
- JOLY (P.), 1966. — Recherches sur les inhibitions de la germination observées dans les semis multispores du *Trichothecium roseum*. *Rev. Mycologie*, **31**, p. 233-243.
- KATO (Y.), 1964. — Physiological and morphogenetic studies of fern gametophytes in aseptical culture. II. One and two dimensional growth in sugar media. *Bot. Gaz.*, **125**, p. 33-37.
- KEIL (M.), 1949. — The origin of the moss gametophyte in culture without access of light. *Experientia*, **5**, p. 206.
- KEILLOVA-KLÉCKOVA (V.), 1959. — Contributions to the physiology of Bryophytes. Some amino-acids as the source of nitrogen and carbon and their influence. *Preslia (Praha)*, **31** (2), p. 166-178.
- KEY (J. L.) et SHANNON (J. C.), 1964. — Enhancement by auxin of ribonucleic acid synthesis in excised soybean hypocotyl tissue. *Plant. Physiol.*, **39**, p. 360-364.
- KIYOSKI KADOWAKI, KAZUO YAMAGUCHI et BUNJI MARUO, 1966. — Effect of actinomycin-D on protein, ribonucleic acid, and enzyme formation in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **12**, n° 2, p. 157-161.

- KLEIN (B.), 1967. — Versuche zur Analyse der Protonemaentwicklung der Laubmoose. IV. Der endogene Faktor H und seine Rolle in der Morphogenese von *Funaria hygrometrica*. *Planta*, **73**, p. 12-27.
- KOFLER (L.), 1951. — Action du 2-4-dichlorophenoxyacétate de sodium sur le gamétophyte de *Funaria hygrometrica*. *C. R. Acad. Sci.*, **232**, p. 1958-1961. — 1956. Différentes formes de croissance et de développement du protonéma de *Funaria hygrometrica* en culture *in vitro*. *C. R. Acad. Sci.*, **242**, n° 13, p. 1755-1758. — 1959 a. Contribution à l'étude biologique des mousses cultivées *in vitro* : germination des spores, croissance et développement du protonéma chez *Funaria hygrometrica*. *Rev. Bryol. Lichen.*, **28**, n° 1-2, p. 1-102. — 1959 b. Rôle de la gélose dans une manifestation précoce de carence en manganèse chez *Funaria hygrometrica*. *Bull. Soc. Franç. Physiol. Végét.*, **5**, p. 57-58.
- KOFLER (L.) et DUTEL (J.), 1963. — Variations in the geotropic sensitivity of germinating *Funaria* spores in response to some external influences. *J. Linn. Soc. London. Bot.*, **58**, n° 373, p. 311-396.
- LARPENT (J. P.), 1966. — Caractère et déterminisme des corrélations d'inhibition dans le mycélium jeune de quelques champignons. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **7**, p. 1-130. — 1968. Contribution à l'étude des manifestations de la polarité cellulaire dans le thalle du *Draparnaldia mutabilis* (Roth) Bory. *C. R. Acad. Sci.*, **267**, p. 583-585.
- LARPENT-GOURGAUD (M.), 1968 a. — Importance de l'inoculum (nombre de spores) et croissance du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Hedw.). *C. R. Acad. Sc.*, **267**, p. 66-69. — 1968 b. Etude comparée de la croissance et de la ramification d'un protonéma issu d'une spore soit de cellules portonématiques isolées. *Rev. Bryol. Lichen* (sous presse). — 1968 c. La notion de rhizoïde chez les germinations de spores de *Funaria hygrometrica* (Hedw.). *C. R. Acad. Sc.*, **267**, p. 2312-2315. — 1969 a. Action comparée de trois inhibiteurs d'acides nucléiques sur la croissance et la ramification du protonéma de *Ceratodon purpureus* (Brid.). *C. R. Acad. Sc.* (sous presse). — 1969 b. Action de la D-actinomycine sur le bourgeonnement, à l'obscurité, du protonéma de *Funaria hygrometrica* (Hedw.). *C. R. Acad. Sc.* (sous presse).
- LAZARENKO (A. S.), KOVALENKO (A. P.) et PASHUK (Ch. E.), 1961. — Some spiral patterns of the protonema in mosses. *Ukrain. Bot. Zhur.*, **18** (6), p. 89-98.
- LEROUX (M.), 1967. — Contribution à l'étude de la croissance et de la différenciation des protonémas primaire et secondaire de *Leptobryum pyriforme* (Hedw.) Schpr. Diplôme d'Etudes supérieures, Clermont-Ferrand.
- LINDENMAYER (A.) et SCHOEN (H. F.), 1967. — Selective effects of purine and pyrimidine analogs and of respiratory inhibitors on perithecial development and branching in *Sordaria*. *Plant Physiol.*, **42**, p. 1050-1070.
- MACHLIS (L.) et DOYLE (W. T.), 1962. — Submerged growth of pure cultures of the liverwort *Sphærocarpus donnellii*. *Physiol. Plant.*, **15**, n° 2, p. 351-353.
- MADER (W), 1952. — Nährsalzmangelkulturen von *Marchantia polymorpha*. *Phyton* (Horn, N-Ö), **4**, p. 124-131.
- MÄGDEFRAU (K.), 1933. — Versuche über den Einfluss der Ernährung auf den Thallusbau von *Marchantia polymorpha*. *Ber. dtsch. Bot. Ges.*, **51**, p. 106-111.
- MALTZAHN (K. E. von), 1959. — Interaction between kinetin and indole-acetic acid in the control of bud reactivation in *Splachnum ampullaceum* (L.) Hedw. *Nature*, **183**, p. 60-61.
- MANDEL (H. G.), 1957. — Incorporation of 8-azaguanine and growth inhibition in *Bacillus cereus*. *Journ. Biol. Chem.*, **225**, p. 137-150. — 1961. Further studies on the modifications of nucleic acid synthesis of *Bacillus cereus* by 8-azaguanine. *J. Pharm. Exp. Ther.*, **133**, n° 2, p. 141-150.
- MANDEL (H. G.) et ALTMAN (R. L.), 1960. — The depression of the incorporation of sulfur amino acids into *Bacillus cereus* by 8-azaguanine. *J. Biol. Chem.*, **235**, n° 7, p. 2029-2035.
- MARCOU (D.), 1961. — Notion de longévité et nature cytoplasmique du déterminisme de la sénescence chez quelques champignons. *Ann. Sc. Nat. Bot.*, **2**, p. 655-756.

- MILLER (J.), 1968. — An evaluation of specific and non-specific inhibition of two dimensional growth in fern gametophytes. *Phys. Plant.*, **21**, p. 699-710.
- MILLER (J. H.) et MILLER (P. M.), 1961. — The effect of different light conditions and sucrose on the growth and development of the gametophyte of the fern *Onoclea sensibilis*. *Amer. J. Bot.*, **48**, p. 158-159. — 1965. The relationship between the promotion of elongation of fern protonema by light and growth substances. *Amer. J. Bot.*, **52**, n° 9, p. 871-876.
- MITRA (G. C.) et ALLSOPP (A.), 1959. — The effects of various physiologically active substances on the development of the protonema and bud formation in *Pohlia nutans* (Hedw.) Linfb. *Phytomorphology*, **9**, p. 55-63.
- MITRA (G. C.), ALLSOPP (A.) et WAREING (P. F.), 1959. — The effects of light of various qualities on the development of the protonema and bud formation in *Pohlia nutans* (Hedw.) Lindb. *Phytomorphology*, **9**, n° 1, p. 47-55.
- MITRA (G. C.), MISRA (L. P.) et PRABHA (C.), 1965. — Interaction of red and blue light on the development of the protonema and bud formation in *Pohlia nutans*. *Planta*, **65**, p. 42-48.
- MOHR (H.), 1965. — Die Kontrolle der Farn- und Moossporenkeimung durch Licht. *Biologische Rundschau*, **2** (4), p. 153-164.
- MOHR (H.) et HOLL (G.), 1964. — Die Regulation der Zellaktivität bei Farnvorkeimen durch Licht. *Z. Bot.*, **52**, p. 209-221.
- MOTHES (K.), ENGELBRECHT (L.) et KULAJEWA (O.), 1960 b. — Ueber das Altern der Blätter und die Möglichkeit ihrer Wiederverjüngung. *Naturwiss*, **47**, p. 337-351.
- NOGUCHI (A.) et MIYATA (I.), 1957. — Sporelings and regenerats in some mosses. 1,2 - *Kumamoto J. Sci.*, **3**, p. 1-19.
- NOODEN (L. D.) et THIMANN (K. V.), 1963. — Evidence for a requirement for protein synthesis for auxin-induced cell enlargement. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S.)*, **50**, p. 194-200. — 1965. Inhibition of protein synthesis and of auxin-induced by chloramphenicol. *Plant Physiol.*, **40**, p. 193-201.
- OBERHEIDT (K.), 1931. — Die Entwicklung der Protonemata und die Anlage der Stämmchen bei einigen Laubmoosen. *Thèse, Marburg*.
- CEHLKERS (F.), 1965. — Entwicklungsgeschichte Röntgeninduzierter Mutanten von *Funaria hygrometrica* L. *Z. Vererbungslehre*, **96**, p. 234-249.
- CEHLKERS (F.) et BOPP (M.), 1957. — Entwicklungsphysiologische Untersuchungen an Moosmutanten. II. Die Korrelation zwischen Sporogon und Kalyptra bei Mutanten von *Funaria* und *Physcomitrium*. *Z. Vererbungslehre*, **88**, p. 608-618.
- OHLENROTH (K.) et MOHR (H.), 1964. — Die Steuerung der Protein-synthese und der Morphogenese bei Farnvorkeimen durch Licht. *Planta*, **59**, p. 427-441.
- OOTA (Y.), 1964. — RNA in developing plant cells. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, **15**, p. 17-36.
- PARÈS (Y.), 1958. — Etude expérimentale de la morphogenèse du gamétophyte de quelques Filicinaées. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Vég. Fr.*, **19**, n° 1, p. 1-120.
- PENOT (M.), 1965. — Etude du rôle des appels moléculaires dans la circulation libérienne. *Physiol. Vég.*, **3**, n° 1, p. 41-89.
- PRINGSHEIM (E.) et PRINGSHEIM (O.), 1935. — Physiologische Studien an Moosen. III. Die Züchtung von Laubmoosprotonemen im Dunkeln. *Jahr. f. Wiss. Bot.*, **82**, p. 311-332.
- PUISEUX-DAO (S.), 1962 a. — Recherches biologiques et physiologiques sur quelques Dasycladacées. *Rev. Gén. Bot.*, p. 819-820; 409-503. — 1962 b. Action de la ribonucléase sur les cellules vivantes d'un *Mougeotia* sp. (conjugatophycées, chlorophycées). *J. Microscopie*, **1**, p. 473-476. — 1964. Action de la ribonucléase sur des cellules vivantes de *Mougeotia* sp. (conjugatophycées, chlorophycées). I. Structure cellulaire du *Mougeotia* placé dans un milieu de culture contenant de la ribonucléase. *J. Microscopie*, **3**, p. 207-224.
- RABINOWITCH (E.), 1956. — *Photosynthesis and related processes*. Vol. II, part. 2. Kinetics of photosynthesis (Continued). Addenda to vol. II, part. 1, p. 21. —

1951. « *Photosynthesis and Related Processes* ». Vol. II, part. 1 : Spectroscopy and Fluorescence of Photosynthetic Pigments; Kinetics of Photosynthesis, p. 603-1208. Interscience, New York.
- RAGHAVAN (V.), 1964. — Differentiation in fern gametophytes treated with purine and pyrimidine analogs. *Science*, **146**, p. 1690-1691. — 1965 a. Action of purine and pyrimidine analogs on the growth and differentiation of the gametophytes of the fern *Asplenium nidus*. *Amer. J. Bot.*, **52**, n° 9, p. 900-910. — 1965 b. Actinomycin D : its effects on two dimensional growth in fern gametophytes. *Exper. Cell. Res.*, **39**, n° 2-3, p. 689-692. — 1968. Actinomycin D induced changes in growth and ribonucleic acid metabolism in the gametophytes of Bracken fern. *Amer. J. Bot.*, **55** (7), p. 767-772.
- RAGHAVAN (V.) et HENG FONG TUNG, 1967. — Inhibition of two dimensional growth and suppression of ribonucleic acid and protein synthesis in the gametophytes of the fern, *Asplenium nidus*, by chloramphenicol, puromycin and actinomycin D. *Amer. J. Bot.*, **54** (2), p. 198-204.
- REICH (E.), FRANKLIN (R. M.), SHATKIN (A. J.) et TATUM (E. L.), 1961. — Effect of actinomycin D on cellular nucleic acid synthesis and virus production. *Science*, **134**, p. 556-557.
- REINERT (J.), 1965. — Growth of single cells from *Haplopappus gracilis* and *Vitis vinifera* on synthetic media. *Proceedings of an international conference on plant tissue culture*, p. 393-400.
- RICHARDSON (S. D.), 1957. — Studies of root growth in *Acer saccharinum* L. VI. Further effects of the shoot system on root growth. *Proc. Kon. Ned. Akad. v. Wetensch. Amsterdam, C.* **60**, p. 624-629.
- ROBBINS (W. J.), 1918. — Direct assimilation of organic carbon by *Ceratodon purpureus*. *Bot. Gaz.*, **65**, p. 543-551.
- ROSENSTOCK (G.), 1963. — Zur Frage der Existenz von Wundhormonen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **76**, p. 275-319.
- SCHNEIDER (C. L.), 1942. — On the nastic and traumatic responses in the pea Test. *Am. J. Bot.*, **29**, p. 201-206.
- SCHOENE (K.), 1906. — Beiträge zur Keimung der Laubmoossporen und zur Biologie der Laubmoosrhizoiden. *Thèse, Jena et Flora*, **96**, p. 276-321.
- SCHRAUDOLF (H.), 1966. — Die Wirkung von Phytohormonen auf Keimung und Entwicklung von Farn-prothallien. IV. Die Wirkung von unterschiedlichen Gibberelline und von allo-gibberrellinsäure auf die Auslösung der Antheridienbildung bei *Anemia phyllitidis* L. und einigen Polypodiaceen. *Plant and Cell. Physiol.*, **7**, p. 277-289.
- SERVETTAZ (C.), 1913. — Recherches expérimentales sur le développement et la nutrition des mousses en milieux stérilisés. *Ann. Sc. nat.*, **17**, p. 111-223.
- SKOOG (F.), 1950. — Chemical control of growth and organ formation in plant tissues. *Année Biol.*, **54**, série III-26, p. 545-562.
- SNIDER (P. J.) et RAPER (J. R.), 1958. — Nuclear migration in the basidiomycete *Schizophyllum commune*. *Amer. J. Bot.*, **45**, n° 7, p. 538-540.
- SOBOTA (A. E.), 1967. — The Growth and division of cells in relation to morphogenesis in fern gametophytes. II. The effect of biochemical agents on the growth and development of *Pteridium aquilinum*. *Can. J. Bot.*, **45** (5), p. 595-603.
- SOBOTA (A. E.) et PARTANEN (C. R.), 1965. — Photomorphogenetic studies on the gametophyte of *Pteridium aquilinum* (Abstr.). *Amer. J. Bot.*, **52**, p. 620. — 1966. The growth and division of cells in relation to morphogenesis in fern gametophytes. I. Phytomorphogenetic studies in *Pteridium aquilinum*. *Can. J. Bot.*, **44**, p. 497-506.
- STADLER (D. R.), 1952. — Chemotropism in *Rhizopus nigricans*. The staling reaction. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **39**, p. 499-574.
- STANGE (L.), 1965. — Regeneration in lower plants. *Advan. Morphogenesis*, **4**, p. 111-153.

- STEWART (F. C.), 1958. — Growth and organized development of cultured cells. II. Interpretations of growth from free cell to carrot plant. *Amer. J. Bot.*, **45**, n° 10, p. 709-713. — 1967. Growth and free cells: from mature cells to embryos. *Fertility and Sterility*, **18**, n° 1, p. 85-94.
- STEWART (F. C.), MARION (O.), MAPES (X.) et SMITH (J.), 1958. — Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. *Amer. J. Bot.*, **45**, n° 9, p. 693-703.
- STICK (H.) et PLAUT (W.), 1958. — The effect of ribonuclease on protein synthesis in nucleated and anucleated fragments of *Acetabularia*. *J. Bioph. Bioch. Cytol.*, **4**, p. 119-121.
- SZWEYKOWSKA (A.), 1962. — The effects of kinetin and IAA on shoot development in *Funaria hygrometrica* and *Ceratodon purpureus*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **31**, n° 3, p. 553-557. — 1963. Kinetin induced formation of Gametophores in dark cultures of *Ceratodon purpureus*. *Journ. Exper. Bot.*, **14**, n° 40, p. 137-141. — 1966. Growth regulators in the development of gametophores in mosses. II. Symposium on plant growth regulators, Torun (Poland), 1963. *Nauki Matematyczno-Przyrodnicze*, Zeszyt 12, Biologia VIII, p. 75-80.
- SZWEYKOWSKA (A.) et HANDSZU (A.), 1965. — The effect of kinetin on gametophyte development and protein synthesis in the moss *Ceratodon purpureus*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **34**, n° 1, p. 73-81.
- SZWEYKOWSKA (A.) et MACKOWIAK (T.), 1962. — On the development of gametophytes in *Funaria hygrometrica* and *Ceratodon purpureus* in liquid cultures. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **31**, n° 2, p. 269-274.
- SZWEYKOWSKA (A.), RATAJCZAK (W.) et SCHNEIDER (J.), 1968. — Studies on the activity of kinetin in cultures of *Funaria hygrometrica*. I. Bud inducing activity of kinetin and protein synthesis. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **37**, n° 1, p. 145-155.
- SZWEYKOWSKA (A.) et SCHNEIDER (J.), 1967. — Action of 8-azaguanine and of inhibitors of protein synthesis on bud inducing activity of kinetin in the moss *Ceratodon purpureus*. *Acta Soc. Bot. Polon.*, **36**, n° 4, p. 735-738.
- TABLER (W. A.), 1957. — The influence of the inoculum on variability in comparative nutritional experiments with fungi. *Can. J. Microbiol.*, **3**, p. 803-812.
- THIMANN (K. V.), 1948. — Plant hormones. *The Hormones*, vol. **1**, Academic Press Inc. Publishers, New York, 10, N. Y.
- THOMPSON (R. H.), 1941. — The morphology of *Riella affinis*. I. Germination of the spore and development of the thallus. *Amer. J. Bot.*, **28**, p. 845-855.
- TURIAN (G.), 1967. — Migration transeptale du noyau dans l'hyphe conidiogène de *Neurospora crassa*. *C. R. Acad. Sc.*, **264**, p. 1988-1990.
- UBISCH (G. VON), 1913. — Sterile Mooskulturen. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, **31**, p. 543-552.
- VAARAMA (A.) et TAREN (N.), 1959. — The effect of gibberellic acid and Fungi on spore germination and protonema growth in Mosses. *Botaniska Notiser*, **112** (4), p. 481-488.
- VALANNE (N.), 1966. — The germination phases of moss spores and their control by light. *Annales Botanici Fennici*, **3**, p. 1-60.
- VITRY (F. DE), 1962. — Action de métabolites et antimétabolites sur la croissance et la morphogénèse d'*Acetabularia mediterranea*. *Protoplasma*, **LV**, 2, p. 313-319.
- WARDLAW (C. W.) et SHARMA (D. N.), 1961. — Experimental and analytical studies of Pteridophytes XXXIX. *Ann. Bot.*, **25**, n° 100, p. 477-491.
- WASSINK (E. C.) et RICHARDSON (S. D.), 1951. — Observations on the connection between root growth and shoot illumination in first year seedlings of *Acer pseudoplatanus* L. and *Quercus borealis maxima* (Marsh) Ashe. *Koninkl. Nederl. Akademie van Wetenschappen, Amsterdam*, **45**, n° 5, p. 503-510.
- WENT (F. W.) et THIMANN (K. V.), 1937. — *Phytohormones*. The Mac Millan Company, New York.
- WETTSTEIN (F. V.), 1924. — Morphologie und Physiologie des Formenwechsels der Moose auf genetischer Grundlage. I. *Z. induct. Abstamm. U. Vererb. Lehre*, **33**, p. 1-236.

- WETTSTEIN (D. VON), 1953. — Beeinflussung der Polarität und undifferenzierte Gewebebildung aus Moossporen. *Zeit. f. Bot.*, **41**, p. 199-226. — 1965. Die Induktion und experimentelle Beeinflussung der Polarität bei Pflanzen. *Handb. d. Pflanzenphysiologie*, Bd **15**, 1, p. 275-326.
- WHITTAKER (J. R.), 1968. — *Cellular differentiation*. Dickenson Publishing Company Inc. Belmont. California.
- WICKSON (M.) and THIMANN (K. V.), 1960. — The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. II. The transport of IAA in pea stems in relation to apical dominance. *Physiol. Plantarum*, **13**, p. 530-554.
- WOESLER (A.), 1933. — Entwicklungsgeschichtliche und cytologische Untersuchungen an den Vorkieimen einiger Laubmoose sowie einige Beobachtungen über die Entwicklung der Stämmchen. *Beitr. Biol. Pflanz.*, **21**, p. 59-116.
- YEOH (O. C.) et RAGHAVAN (V.), 1966. — Riboflavin as photoreceptor in the induction of two dimensional growth in fern gametophytes. *Plant Physiology*, **41**, n° 10, p. 1739-1742.
-



PRINTED IN FRANCE